

UNIVERSITE DE SHERBROOKE

COMPLEXE ANTICORPS MONOCLONAL - PHTHALOCYANINE:
EVALUATION COMME OUTIL DE TRAVAIL EN PHOTOTHERAPIE

par



BENOIT PAQUETTE

Mémoire présenté à la Faculté de
Médecine en vue de l'obtention
du grade de maître ès Sciences (M. Sc.)

Le 5 juillet 1987

Permission has been granted to the National Library of Canada to microfilm this thesis and to lend or sell copies of the film.

The author (copyright owner) has reserved other publication rights, and neither the thesis nor extensive extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her written permission.

L'autorisation a été accordée à la Bibliothèque nationale du Canada de microfilmer cette thèse et de prêter ou de vendre des exemplaires du film.

L'auteur (titulaire du droit d'auteur) se réserve les autres droits de publication; ni la thèse ni de longs extraits de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation écrite.

ISBN 0-315-38908-7

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	VI
LISTE DES ABREVIATIONS.....	VII
RESUME.....	VIII
SOMMAIRE.....	IX
INTRODUCTION.....	1
MATERIELS ET METHODES.....	10
1. PHTHALOCYANINE.....	10
1.1 Aspects chimiques.....	10
1.1.1 Synthèse.....	10
1.1.2 Purification.....	10
1.1.3 Détermination du nombre moyen de groupements sulfonés par molécule de phthalocyanine.....	11
1.1.4 Composition des fractions de AlCl ₃ -SPC.....	12
1.1.5 Propriétés spectrales.....	12
1.2 Aspects photocytotoxiques.....	12
1.2.1 Culture des cellules.....	12
1.2.2 Tests de photocytotoxicité.....	13
1.2.2.1 Procédure générale.....	14
1.2.2.2 Contrôles.....	15
1.2.3 Source d'irradiation.....	15
1.2.3.1 Montage.....	15
1.2.3.2 Dose d'irradiation.....	16
1.3 Distribution intracellulaire des AlCl ₃ -SPC.....	16
1.3.1 Intensité de fluorescence.....	16

1.3.2 Microscope à fluorescence.....	17
2. ANTICORPS MONOCLONAL.....	18
2.1 Hybridation.....	18
2.2 Culture in vitro.....	18
2.3 Culture in vivo.....	19
2.4 Purification.....	19
2.4.1 Colonne d'hydroxylapatite.....	19
2.4.2 Electrophorèse.....	20
2.4.3 Chromatographie sur HPLC.....	21
2.5 Caractérisation du McAb.....	21
2.5.1 Monoclonalité.....	21
2.5.1.1 Incorporation de la leucine-C ¹⁴	21
2.5.1.2 Purification, réduction, et alkylation des immunoglobulines marquées au carbone 14.....	22
2.5.1.3 Electrophorèse d'urée-formate et point isoélectrique.....	23
2.5.2 Classe et sous-classe.....	24
2.5.3 Spécificité in vitro.....	25
2.5.4 Nombre d'antigènes par cellule tumorale et constante d'association.....	27
2.5.4.1 Marquage à l'iode 125.....	28
2.5.4.2 Purification par centrifugation sur G-50.....	28
2.5.4.3 Rendement de marquage et de purification.....	29
2.5.4.4 Immunoréactivité.....	29
2.5.4.4.1 Procédure expérimentale.....	30
2.5.4.4.2 Liaison non spécifique.....	31
2.5.4.5 Détermination du nombre d'antigènes par cellule tumorale et de la constante d'association.....	32

2.5.5 Spécificité in vivo.....	33
3. STATISTIQUE.....	34
RESULTATS.....	36
1. PHTHALOCYANINE.....	36
1.1 Effet du degré de sulfonation sur leur efficacité photocytotoxique.....	36
1.2 Relation entre la distribution intracellulaire et le rapport S/PC.....	39
2. ANTICORPS MONOCLONAL.....	42
2.1 Niveau de pureté.....	43
2.2 Preuve de sa monoclonalité.....	45
2.3 Classe de l'immunoglobuline.....	47
2.4 Liaison sélective in vitro sur les cellules MAC.....	48
2.5 Nombre d'antigènes par cellule tumorale et constante d'association.....	49
2.6 Spécificité in vivo.....	52
DISCUSSION.....	56
CONCLUSION.....	66
REMERCIEMENTS.....	68
BIBLIOGRAPHIE.....	70
ANNEXE 1 : Structure des aluminium chloro sulfophthalocyanines.....	80
ANNEXE 2 : Chromatogramme sur HPLC analytique des AlCl ₃ -SPC.....	81
ANNEXE 3 : Calcul de la dose d'irradiation.....	82

LISTE DES FIGURES

1. Photocytotoxicité: Survie cellulaire des V-79 en fonction de la concentration de AlCl ₃ -SPC.....	37
2. Photocytotoxicité: Survie cellulaire des V-79 en fonction du temps d'incubation.....	38
3. Intensité et uniformité de fluorescence des AlCl ₃ -SPC.....	40
4. Distribution intracellulaire des AlCl ₃ -SPC.....	41
5. Chromatographie sur hydroxylapatite de la préparation de McAb.....	43
6. Electrophorèse SDS-PAGE: Identification des chaînes lourdes et légères de l'anticorps monoclonal.....	44
7. Chromatographie sur Superose 12 du McAb: Indice supplémentaire du niveau de purification.....	46
8. Autoradiogramme du point isoélectrique: Preuve de la monoclonalité de notre anticorps.....	47
9. Spécificité in vitro de notre McAb envers les cellules MAC.....	49
10. Immunoréactivité de l'anticorps marqué à l'iode 125.....	51
11. Graphique de Scatchard: Détermination du nombre d'antigènes par cellule tumorale et de la constante d'association.....	52
12. Accumulation de l'anticorps marqué sur la tumeur, poumon, foie et rate en fonction de la dose de McAb froid injectée.....	54
13. Spécificité in vivo du McAb marqué pour les tumeurs MAC à dose maximale de McAb froid.....	55
14. Mécanisme proposé de diffusion trans-membranaire des AlCl ₃ -SPC....	59
15. Chromatogramme sur HPLC analytique des AlCl ₃ -SPC.....	81
16. Spectre d'émission de la lampe tungsten/halogen conjuguée au filtre rouge Corning 2418.....	83

LISTE DES TABLEAUX

1. Détection de la présence du McAb par test ELISA suite à sa chromatographie sur hydroxylapatite.....	44
2. Identification des chaînes protéiques lourdes et légères de l'anticorps monoclonal isolé.....	45
3. Classe et sous-classe du McAb détecté par test ELISA.....	48
4. Distribution in vivo du McAb: Rapport tissu/sang en fonction de la dose de McAb froid injectée.....	53

LISTE DES ABREVIATIONS

AlCl-SPC, aluminium chloro sulfophthalocyanine

DHE, dihematoporphyrine ether

DTT, dithiothréitol

ELISA, "enzyme-linked immunosorbent" essai

GaCl-SPC, gallium chloro sulfophthalocyanine

HpD, dérivé d'hématoporphyrine

HPLC, chromatographie liquide à haute pression

LD₉₀, dose de drogue nécessaire pour tuer 90% des cellules

LT₉₀, temps d'incubation avec la drogue nécessaire pour tuer
90% des cellules

MAC, cellule d'adénocarcinome mammaire 13762

McAb, anticorps monoclonal

ns, nanoseconde

PDT, thérapie photodynamique

PI, point isoélectrique

Rapport S/PC, nombre de groupements sulfonés par molécule de
phthalocyanine

SPC, sulfophthalocyanine

μs, microseconde

RESUME

COMPLEXE ANTICORPS MONOCLONAL - PHTHALOCYANINE: EVALUATION COMME OUTIL DE TRAVAIL EN PHOTOTHERAPIE

Benoit Paquette

Mémoire présenté à la faculté de Médecine de l'Université de Sherbrooke
en vue de l'obtention du grade de maître ès Sciences (M. Sc.) Le 5
juillet 1987.

La formation d'un complexe anticorps monoclonal - phthalocyanine est proposée en vue d'améliorer l'efficacité du traitement anti-tumoral appelé thérapie photodynamique. Cependant, on devait tout d'abord connaître le mode d'action de cette drogue. Nos études nous ont permis de vérifier qu'un AlCl-SPC moins polaire démontrait un plus grand niveau de photocytotoxicité. Ce fait fut relié au caractère amphibique des disulfonés AlCl-SPC où les deux groupements sulfonés se situaient sur des noyaux benzène adjacents. Cette propriété leur a permis de traverser efficacement la membrane cellulaire pour ensuite se diffuser uniformément dans le cytoplasme. Notre McAb a aussi démontré un fort potentiel avec sa constante d'association de $1.6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ et un nombre de sites d'attachement sur la cellule tumorale de 4.5×10^5 . In vivo, la liaison sur la tumeur du McAb- I^{125} fut évidente alors que son niveau d'accumulation était directement proportionnel à la dose de McAb froid injectée. Notre système tumeur - McAb est valide qui et pourra être utilisé comme outil de travail pour étudier la photocytotoxicité d'un complexe McAb - phthalocyanine.

SOMMAIRE

Sous investigation en clinique, la thérapie photodynamique se présente comme un mode d'intervention anti-tumoral relativement sélectif et causant peu de toxicité systémique. Elle emploie de la lumière rouge ($\lambda > 590$ nm) comme source d'irradiation ainsi qu'un photosensibilisateur de type porphyrine (λ_{\max} 630 nm). Malgré qu'une photosensibilisation au niveau de la peau persiste pendant un mois, le traitement est efficace, mais limité aux tumeurs petites et localisées. On propose de l'améliorer en utilisant un complexe anticorps monoclonal - phthalocyanine (McAb-PC). La portion McAb servira de transporteur spécifique diminuant l'accumulation du photosensibilisateur au niveau de la peau tout en augmentant le niveau de drogue sur la tumeur. Tandis que le phthalocyanine avec un λ_{\max} de 674 nm permettra d'utiliser une source lumineuse d'une longueur d'onde plus élevée augmentant la pénétration du rayonnement dans la tumeur.

Afin de préserver l'activité du photosensibilisateur une fois lié au McAb, il importe de connaître le mieux possible son mécanisme d'action. C'est pourquoi le lien entre l'hydrophobicité, l'efficacité photocytotoxique et la distribution intracellulaire de divers AlCl-SPC fut établi. A cette fin, des tests de photocytotoxicité furent utilisés où on a fait varier la concentration de drogue (LD_{90}) puis le temps d'incubation (LT_{90}) avec les cellules V-79. En parallèle, au microscope à fluorescence la distribution intracellulaire des diverses préparations de AlCl-SPC a été étudiée en fonction de leurs polarités, c'est à dire le nombre de groupements sulfonés par molécule de phthalocyanine

(rapport S/PC) qui variait ici de 4 à 2.

Il en ressort qu'une préparation moins polaire était plus photocytotoxique, alors que seuls les disulfonés AlCl-SPC (rapport S/PC 2.0) traversaient significativement la membrane cellulaire pour ensuite se diffuser uniformément dans le cytoplasme. Le AlCl-PC et le monosulfoné AlCl-PC ont été exclus de ces études en raison de leur insolubilité dans le milieu aqueux. De l'analyse de ces résultats, un mode de diffusion trans-membranaire a été proposé où un phthalocyanine avec ces deux groupements sulfonés situés sur des noyaux benzène adjacents pénétrerait la cellule en exploitant sa propriété amphibique. Ainsi sa section hydrophobe s'enfoncerait favorablement dans la membrane lipidique alors que les groupements sulfonés interagiraient avec une protéine trans-membranaire pour ainsi permettre sa diffusion dans le cytoplasme.

Dans un deuxième temps, le potentiel de notre McAb comme transporteur spécifique et efficace a été évalué. Grâce à des tests ELISA, notre McAb a démontré une spécificité in vitro pour ses cellules tumorales cibles (MAC). Tandis qu'à l'aide de test d'immunoréactivité et d'analyse de Scatchard, ses qualités de transporteur ont été mises en évidence avec une constante d'association de $1.6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ et un nombre d'antigènes cible par cellule tumorale de 4.5×10^5 . L'accessibilité sur la tumeur de ses antigènes fut vérifiée par une étude de distribution in vivo chez le rat Fischer femelle 344/CRBL préalablement inoculées de façon intradermique les cellules MAC. La liaison du McAb- I^{125} sur la tumeur était évidente. Cependant, étant de classe IgG_{2a}, notre McAb

avait tendance à former des liens non spécifiques avec les macrophages principalement situés aux poumons, foie et rate. L'accumulation tumorale devenait donc proportionnelle à la quantité de McAb froid co-injectée.

En conclusion, notre système tumeur - McAb est valide et pourra être utilisé comme outil de travail pour étudier la photocytotoxicité d'un complexe McAb-phthalocyanine.

INTRODUCTION

Deuxième plus importante cause de décès, le cancer a entraîné la mort de près de un demi-million d'américains en 1983 tandis que 1.3 millions de nouveaux cas furent rapportés (Silverberg et Lubera, 1983). En terme de probabilité réelle, 25% de la population nord américaine est ou sera touchée. Les seins, le colon et les poumons figurent parmi ses cibles préférées et les personnes atteintes meurent, principalement, des métastases qui en résultent (Poste et Richard, 1983). Ces faits, bien qu'éloquents, nous semblent maintenant presque familier. On connaît aussi les approches cliniques utilisées, leurs efficacités ainsi que leurs limites thérapeutiques.

La chirurgie et la radiothérapie s'attaquent principalement aux tumeurs primaires localisées laissant à la chimiothérapie la lourde tâche d'éliminer les métastases (Khoury et al., 1979). Cependant, l'efficacité de cette dernière est limitée, entr'autre, par son propre mécanisme d'action général. Ainsi la plupart des agents chimiothérapeutiques ne se fixent pas sélectivement sur les cellules tumorales (Garrett DeYoung, 1986). Ils ne font qu'affecter davantage les cellules en divisions rapides laissant souvent pour compte les cancers à progression lente. En plus, les muqueuses et la moelle osseuse, constituées de cellules en division rapide, deviennent alors le siège de nombreux effets secondaires dont des troubles digestifs (nausé, vomissement), et d'un affaiblissement général du système immunitaire. Génétiquement instable, les cellules cancéreuses se transforment au hasard et de façon spontanée si bien que d'une population cellulaire

initialement sensible peut apparaître des cellules résistantes à tous les agents chimiothérapeutiques actuellement disponibles (Kolata, 1986; Goldie et Coldman, 1985). La présence de la drogue dans la cellule favoriserait la fabrication d'une glycoprotéine membranaire (P 170) qui pompe l'intrus à l'extérieur avant que celui-ci ait eu le temps d'exercer son action toxique.

Tout ceci semble bien sombre et pessimiste, mais le cancer n'est pas pour autant incurable. Il se guérit et d'autant plus facilement s'il est traité à un stade précoce où la population de cellules cancéreuses est plus uniforme et moins répandue. Cependant l'importance d'élargir l'arsenal anti-tumoral s'impose. Un traitement unique et universel n'existera probablement jamais, mais conscient des limites actuelles (effets secondaires et résistance cellulaire), on peut élaborer de nouvelles approches qui compléteront celles déjà existantes.

Nous avons donc exploré la possibilité d'augmenter l'efficacité d'un traitement nouveau et unique, la thérapie photodynamique (PDT), en travaillant avec un complexe anticorps monoclonal - phthalocyanine (McAb - PC) comme sensibilisateur. La partie McAb servira de transporteur permettant: d'améliorer la sélectivité, d'augmenter la concentration de drogue dans la cellule tumorale et de diminuer la toxicité systémique. Tandis qu'on utilisera la propriété photosensibilisatrice du phthalocyanine pour réduire la toxicité systémique et éliminer les cellules tumorales. En effet, les photosensibilisateurs en général deviennent toxique que lorsqu'exposés à la lumière rouge (Land, 1984; Dougherty, 1985a). Cette dernière est donc dirigeable et l'intervalle thérapeutique ne durera que le temps de l'irradiation, soit environ 30

minutes.

Maintenant que les grandes lignes du projet sont cernées, nous allons jeter un regard critique sur les travaux effectués sur les phthalocyanines et les anticorps monoclonaux employés seuls afin d'en ressortir les points forts et les limites. On soutiendra ainsi la faisabilité du projet et on mettera en évidence les paramètres à respecter pour atteindre notre but.

Les photosensibilisateurs sont déjà étudiés en clinique. Ce traitement, appelé "thérapie photodynamique" (PDT), utilise des photosensibilisateurs de type porphyrine ainsi qu'une source d'irradiation ajustée à 630 nm. La fraction active dans les préparations de dérivé d'hématoporphorine (Hpd) fut probablement cernée et consisterait en un dimère, soit le dihématoporphorine éther ou ester (DHE). Plusieurs cas cliniques ont été rapportés où il en ressort que ce traitement s'avère curatif pour certaines tumeurs petites et localisées (ex. peau, vessie) et palliatif dans des cas avancés comme le cancer des poumons (Balchum et Doiron, 1985; Dougherty, 1985a,1985b; Hayata et al.,1985).

Bien que prometteur, les porphyrines employées seules s'avèrent thérapeutiquement limitées. La lumière qu'elles absorbent pénétre peu (2-8 mm selon la pigmentation du tissu) tandis que leur accumulation tumorale pourrait être améliorée (Moan, 1986). La toxicité systémique est faible, mais une accumulation au niveau de la peau y amène une sensibilité à la lumière du jour qui persiste pendant environ un mois et

qui se manifeste par des érythèmes et des oedèmes jusqu'à la nécrose (Mew et al., 1983).

La thérapie photodynamique fonctionne. Cependant son efficacité pourrait être améliorée.

D'autres photosensibilisateurs furent alors proposés dont les phthalocyanines sur lesquels on ajoute des groupements sulfonés afin d'en augmenter la solubilité (Brasseur, 1985; Ben-Hur et Rosenthal, 1985). Leurs principaux avantages sur les porphyrines utilisées en essai clinique se décrivent comme suit: a) absorption lumineuse à une longueur d'onde plus élevée amenant une meilleure pénétration (20% dans la peau et 50% dans le cerveau), b) meilleur coefficient d'extinction molaire (48 fois supérieur) augmentant l'efficacité d'absorption lumineuse, c) structure chimique mieux définie, d) non toxique et e) photochimiquement stable (Spikes, 1986). Ce nouveau photosensibilisateur bien qu'il semble très prometteur a-t-il vraiment tout le potentiel pour être utilisé en PDT? Des études à différents niveaux ont été effectuées pour en vérifier le potentiel photocytotoxique.

La photocytotoxicité de ces photosensibilisateurs s'appuie sur un mécanisme d'absorption lumineuse. Dotés d'un grand cycle en résonnance, ils absorbent un photon d'une longueur d'onde élevée (674 nm). Ce transfert d'énergie l'excite à un état appelé singulet de courte demi-vie (AlCl-TSPC: 5,3 ns). Deux possibilités s'offrent alors à lui soit de revenir à l'état fondamental ou d'effectuer un "intersystem crossing" l'amenant à un état triplet beaucoup plus stable (AlCl-TSPC: 500 μ s).

L'ion métallique servant à stabiliser le phthalocyanine excité, le temps de demi-vie de l'état triplet variera en fonction du métal utilisé ainsi que son rendement de formation. Cette stabilité accrue augmente sa réactivité qui se manifeste principalement par des photooxygénations de type II où l'oxygène absorbe l'énergie de l'état triplet. Plus réactif, l'oxygène ainsi excité s'appellera maintenant oxygène singulet et il formera principalement des peroxides sur les biomolécules environnantes riches en électrons. Notez aussi que seule la forme monomérique des phthalocyanines est photoactive. En effet, les dimères et les agrégats sont, d'un point de vue photochimique, inactifs. En solution, on les éliminera en travaillant dans un milieu hautement soluble comme, par exemple, 100% méthanol ou 5% pyridine (Darwent et al., 1982; Foote, 1984).

Des études biomoléculaires ont été effectuées afin d'évaluer le potentiel cytotoxique de l'oxygène singulet ainsi formé. Il en ressort qu'en solution on peut efficacement oxyder certaines biomolécules comme: cystéine, histidine, méthionine, tryptophane, tyrosine, guanine, lipides insaturés, phospholipides et cholestérol (Langlois et al., 1986; Foote, 1982; Spikes, 1983; Straight et Spikes, 1986a). Les protéines, l'ADN et les membranes lipidiques pourraient donc être attaqués par l'oxygène singulet selon la distribution intracellulaire du phthalocyanine. In vitro, des études comparatives ont été exécutées pour évaluer le potentiel photocytotoxique de divers métallo-sulfophthalocyanines (Brasseur et al., 1985; Ben-Hur et Rosenthal, 1985, 1986; Chan et al., 1986). Certains de ces nouveaux photosensibilisateurs ont démontrés un bon niveau de photocytotoxicité dont ceux ayant le zinc, le gallium ou

l'aluminium comme métal. Le cérium-SPC s'est même avéré cinq fois plus phototoxique que l'hématoporphyrine.

Bien que leur mécanisme d'action intracellulaire ne soit pas connu, il a été démontré qu'indépendamment de l'effet de l'ion métallique une fraction moins polaire de phthalocyanine engendre une plus grande photocytotoxicité (Brasseur et al., 1987b). Cette polarité est un reflet du nombre et des sites d'attachement des groupements sulfonés et devrait donc être précisée afin d'optimiser l'effet photocytotoxique. Cette précision permettra aussi d'identifier plus exactement lequel des métallo-sulfophthalocyanines a réellement le plus de potentiel. Néanmoins, in vitro certains métallo-SPC sont plus phototoxiques que les porphyrines.

In vivo peu d'études ont été faites jusqu'à présent pour évaluer leur potentiel en thérapie photodynamique (Brasseur et al., 1987b ; Bown et al., 1986; Selman et al., 1986; Spikes, 1986). Cependant mentionnons que les AlCl-SPC, GaCl-SPC et Ce-SPC bien que prometteurs in vitro s'avèrent ne pas être plus efficaces que le DHE in vivo en plus de causer la même toxicité à la peau. Tandis que le Zn-SPC serait seulement 1.6 fois plus efficace que le Hpd.

En résumé, les phthalocyanines oxydent efficacement des biomolécules via l'oxygène singulet, ils ont un effet photocytotoxique (in vitro) supérieur aux porphyrines (DHE et Hpd), mais les résultats en PDT (in vivo) ne sont pas assez convainquant pour surclasser ces dernières. L'optimisation du nombre et du site d'attachement de leur groupements sulfonés s'avère donc nécessaire pour en savoir plus sur

leur mécanisme d'action intracellulaire, et aussi pour augmenter leur efficacité. Alors qu'in vivo, il serait intéressant d'augmenter leur spécificité et leur accumulation tumorale tout en supprimant la toxicité à la peau.

Ce problème de spécificité et d'accumulation tumorale devrait être réglé en utilisant un transporteur tumoral spécifique, un anticorps monoclonal. Cependant, en pratique peut-on bénéficier de sa grande spécificité et est-il vraiment efficace en thérapie? Un nouveau tour d'horizon de la littérature nous permettra de répondre à ces questions ainsi que d'apprendre à connaître les paramètres à respecter afin d'obtenir une thérapie efficace.

Leur sélectivité in vivo ne fait aucun doute (Poste et Kirsh, 1983). Les anticorps monoclonaux (McAb) sont d'ailleurs sous investigation comme outil d'imagerie en médecine nucléaire où malgré des débuts difficiles (Mach, 1981), ils sont maintenant considérés comme étant beaucoup plus prometteurs. On commence donc à connaître les paramètres à contrôler pour améliorer sa localisation tumorale (Tosen et al., 1985; Larson, 1985; Keenan, 1987). Parmi les plus appropriées à notre étude, on dénote l'importance 1- d'avoir un antigène accessible in vivo, 2- un grand nombre d'antigènes par cellule cible (celui-ci pouvant varier de 1 à 10^6), 3- une constante d'association supérieure à 10^{10} M^{-1} et 4- peu ou pas d'antigène circulant qui captent le McAb avant qu'il arrive à la tumeur. En imagerie, les cliniciens préfèrent aussi utiliser les fragments F(ab) ou F(ab)₂ de l'anticorps qui s'éliminent plus rapidement de l'organisme augmentant le rapport de localisation tumeur/

sang. Cependant l'anticorps complet, avec son fragment Fc, aurait tendance à s'accumuler davantage sur la tumeur (Ballou, 1985; Khaw, 1984; Rosen et al., 1985).

En second lieu, l'analyse des essais thérapeutiques nous permet de souligner des points très importants dont certains devront être considérés dans le but d'optimiser le traitement visé. Premièrement, un anticorps monoclonal ne peut pas être employé seul, car son mode d'action cytotoxique implique la participation de cellules effectrices comme des macrophages et cellules K dont le niveau semble malheureusement être assez faible au site tumoral (Levy et Miller, 1983). Le McAb n'en demeure pas moins un bon transporteur servant de véhicule à diverses drogues. La réussite de la thérapie est cependant liée à la connaissance du mode d'action de la drogue, car il faut être capable de répondre aux questions suivantes: 1- est-il nécessaire d'internaliser la drogue dans la cellule, 2- doit-on se rendre au noyau, 3- la drogue doit-elle se détacher du McAb pour pouvoir être active et le McAb doit-il être spécifique à 100% ? Une fois ces paramètres connus, on pourra améliorer l'efficacité du traitement en augmentant le nombre de drogue liée par molécule de McAb qui peut varier de 1 à environ 40 selon le mode de liaison utilisé (Harwitz et al., 1975; O'Shannesy et al., 1984). L'utilisation d'une mixture d'anticorps monoclonaux s'avèrera aussi profitable, car 5 % cent des cancers sont d'origine multiclonale, tandis que les métastases, à cause de leur instabilité génétique, peuvent ne pas exprimer les mêmes antigènes que la tumeur primaire (Levy et Miller, 1983; Poste et Kirsh, 1983).

Finalement, un dernier facteur très important peut affecter

l'efficacité du traitement. Il s'agit de la modulation antigénique où l'antigène, suite à son interaction avec l'anticorps, n'est plus exprimé à la surface de la cellule (Ritz et al., 1981). L'utilisation d'une seule dose très toxique ou, si possible, d'une mixture de McAb devrait alors être envisagée.

Ce tour d'horizon de la littérature nous a non seulement permis de constater la faisabilité du projet de recherche, mais surtout d'établir les balises à respecter et à connaître pour obtenir une thérapie efficace. Par conséquent, il en ressort l'importance de connaître la distribution intracellulaire du phthalocyanine employé seul afin d'évaluer si sa liaison avec le McAb peut inhiber son action thérapeutique. A cette fin, nous tenterons d'établir le lien étroit entre la distribution intracellulaire et le niveau de photocytotoxicité en fonction du ratio S/PC de différents aluminium chloro sulfophthalocyanines (AlCl-SPC). Pour ce faire, nous effectuerons des tests de photocytotoxicité et des études au microscope à fluorescence.

Dans un deuxième temps, on s'est concentré sur l'anticorps monoclonal qui, après avoir été produit et caractérisé, fut évalué comme outil potentiel de travail. Ainsi on a déterminé le nombre d'antigènes par cellule tumorale, la constante d'association et vérifié l'accessibilité de l'antigène in vivo via une étude de distribution avec marquage du McAb à l'iode 125. Ces expériences sont exécutées avec l'anticorps complet dont la section Fc servira éventuellement à lier le photosensibilisateur dans des travaux subséquents.

MATERIELS ET METHODES

1. PHTHALOCYANINE

1.1. ASPECTS CHIMIQUES

1.1.1. SYNTHÈSE

Le AlCl-PC fut acheté de Eastman Kodak et sulfoné avec de l'acide sulfurique fumant pendant 4 h à 75⁰C afin de produire un mélange d'isomères contenant des mono, di, tri et tetrasulfonés AlCl-SPC (Linstead et Weiss, 1950). Notez que le groupement sulfoné peut occuper la position 3 ou 4 sur chacun des anneaux benzène du phthalocyanine (voir annexe 1).

1.1.2. PURIFICATION

Une fois la sulfonation terminée, les AlCl-SPC étaient précipités en versant délicatement le mélange réactionnel encore chaud sur de la glace concassée. Après filtration sur une membrane Nylon 66 de 0.22 µm, le précipité a été dissout à l'aide d'une solution de NaOH 1.0 N jusqu'à pH 11. Après une seconde filtration, le filtrat, contenant les AlCl-SPC, était neutralisé avec une solution de HCl.

Une colonne à pression moyenne remplie de C-18 (Polygosil, 30 cm de long par 2 cm de diamètre) était ensuite utilisée pour isoler les fractions majeures. La chromatographie a débuté par une étape isocratique avec un tampon 10mM phosphate de sodium pH 5 (tampon A)

pendant environ 20 minutes. Ensuite, un gradient a été effectué en ajoutant progressivement pendant 2 h un deuxième tampon, 5% phosphate de sodium 200mM pH 5 et 95% méthanol (tampon B).

Après cette chromatographie, les trois fractions isolées furent dessalées sur la même colonne en éluant tout d'abord avec 100ml d'eau suivi de 40ml 20% méthanol et, jusqu'à la fin le l'élution, avec 100% méthanol. L'analyse du contenu de ces fractions a été faite à l'aide d'une colonne en phase inverse C-18 (ODS-2 spherisorb 5 μ m, 25 cm de long par 0.94 cm de diamètre) installée sur un HPLC. Les tampons utilisés étaient les mêmes que précédemment et le gradient utilisé fut le suivant: 100% du tampon A suivi de l'addition progressive du tampon B jusqu'à 100% de ce dernier après 55 minutes d'élution. Le débit d'élution était de 2 ml par min tandis que le détecteur était réglé à 650 nm (Langlois et al., 1986).

1.1.3. DETERMINATION DU NOMBRE MOYEN DE GROUPEMENTS SULFONES PAR MOLECULE DE PHTHALOCYANINE

Le rapport S/PC (nombre de groupements sulfonés par molécule de phthalocyanine) fut déterminé grâce à une méthode d'oxydation de ces produits sulfonés en phthalimide et sulfophthalimide. Brièvement, les AlCl-SPC étaient chauffés dans l'acide nitrique ($\sim 40^{\circ}\text{C}$), neutralisé et injectés sur un HPLC (phase inverse) programmé pour obtenir le gradient suivant: 0 à 5 min., TFA 0.1%; 35 min. 100% méthanol. En utilisant le phthalimide comme standard, le temps d'élution des 2 produits de l'oxydation a été déterminé et le calcul du rapport S/PC fut effectué en évaluant la surface de chacun de ces pics (Ali et al, soumis).

1.1.4. COMPOSITION DES FRACTIONS DE AlCl-SPC

Après la purification, la détermination du rapport S/PC et l'analyse par HPLC, on a conclu que nos trois fractions de AlCl-SPC contenaient: fraction (A) 40% de trisulfoné avec 60% de tetrasulfoné (rapport S/PC de 3.6), fraction (B) 30% de disulfoné (isomères les moins hydrophobes) et 70% de trisulfoné AlCl-SPC avec un rapport S/PC de 2.7 et fraction (A) un mélange de 90% de disulfoné (l'isomère le plus hydrophobe) et 10% de disulfoné AlCl-SPC moins hydrophobes avec un rapport S/PC de 2.0. Le chromatogramme sur HPLC analytique (annexe 2) illustre bien le patron de purification utilisé ainsi que la composition de chaque fraction.

1.1.5. PROPRIETES SPECTRALES

En milieux aqueux, les sulfophthalocyanines plus hydrophobes auront d'avantage tendance à s'agréger comparativement à ceux plus hydrophiles. Il en résulte une diminution plus marquée de leur coefficient d'absorption molaire. En prenant nos lectures spectrométriques dans le méthanol, l'agréation était éliminée ce qui uniformise le coefficient d'absorption molaire. Une valeur de $192\ 000\ \text{M}^{-1}$ était alors obtenu tandis que la longueur d'onde d'absorption maximale se situait à 674 nm. cm^{-1} .

1.2. ASPECTS PHOTOCYTOTOXIQUES

1.2.1. CULTURE DES CELLULES

Nous avons utilisé la lignée V-79 des cellules fibroblastiques pulmonaires de Hamster Chinois (Gray Laboratory, Northwood England). Ces cellules étaient cultivées à 37⁰ C (5% CO₂) à l'aide de boîtes de 25 cm² de surface contenant du milieu MEM additionné de 1% vitamines, 1% L-glutamine et 10% de sérum foetal de veau (Gibco). A confluence, les cellules étaient passées de la façon suivante. Après avoir retiré le milieu de culture et lavé avec du PBS stérile, 400µl de trypsine 0.25% (Gibco no cat 610-5050) était incubé avec les cellules pendant 2 à 3 minutes. Celles-ci étaient ensuite resuspendues dans 5ml de milieu de culture frais puis redistribuées (2 à 4 gouttes) dans de nouvelles boîtes contenant du milieu. Les passages s'effectuaient deux fois par semaine.

1.2.2. TESTS DE PHOTOCYTOTOXICITE

Dans le but d'évaluer la différence de photocytotoxicité des AlCl-SPC en fonction de leur degré de sulfonation, 2 types d'expérience ont été exécutées. Dans un premier temps, nos cellules V-79 étaient incubées pendant 1 h avec des concentrations croissantes de AlCl-SPC (0.25-50 µM) mises en solution dans 1 ml de milieu MEM additionné de 1% sérum. Dans un deuxième temps, la concentration de photosensibilisateur était fixée à 2 µM tandis que le temps d'incubation variait de 0.25 à 24 h. Veuillez noter que cette fois-ci la drogue était dissoute dans 3 ml du milieu OPTI-MEM (Gibco) additionné de 1% sérum, 1% L-glutamine et 1% vitamines ; ce nouveau milieu permettait la croissance cellulaire prolongée avec aussi peu que 1% sérum. Le reste de ces 2 expériences suivaient la procédure générale.

1.2.2.1. PROCEDURE GENERALE

Ce test de survie cellulaire est décrit dans Brasseur et al. (1985). On utilisait des cellules V-79 en phase de croissance logarithmique dont la viabilité était supérieure à 96% selon le test d'exclusion au bleu de trypan. Deux cents cellules étaient inoculées dans des boîtes de pétris de 60 mm de diamètre contenant 5 ml du milieu de culture. Ces boîtes de pétris étaient ensuite placées dans l'incubateur pendant 3 h afin de permettre l'attachement des cellules. Après lavage au PBS, les cellules furent incubées avec le photosensibilisateur selon les spécificités de chacun des 2 tests précédemment décrits.

Aussitôt cette incubation terminée, la drogue fut retirée et les cellules lavées au PBS. Celles-ci étaient ensuite irradiées pendant 4 minutes à l'aide d'une source de lumière rouge puis incubées pendant 6-7 jours dans 5 ml de milieu de culture complet. Les colonies ainsi formées étaient fixées avec 10% formaline, colorées avec le cristal violet 0.5% et comptées. Notez que seulement les colonies contenant plus de 50 cellules furent considérées.

Chaque point expérimentale était effectué en triplicata et la courbe de survie finale illustre la compilation de trois expériences subséquentes et cohérentes. Finalement, la survie cellulaire s'obtenait à l'aide du calcul suivant dont le résultat était porté sur un papier graphique semi-log 3 cycles.

$$\frac{\text{Nombre de colonies d'un point expérimentale}}{\text{Nombre de colonies du contrôle d'inoculation}} \times 100$$

1.2.2.2. CONTROLES

Quatre séries de contrôles furent aussi effectuées dans ces tests de photocytotoxicités. Premièrement, l'efficacité d'inoculation de nos cellules dans les boîtes de pétris a été testée en poursuivant l'incubation de trois pétris après les 3 h d'attachement. Deuxièmement, on a évalué l'effet sur la croissance cellulaire d'une incubation pendant 0.25 à 24 h dans du milieu de culture contenant, seulement, 1% de sérum. Troisièmement, la toxicité de la dose de lumière employée seule a été évalué et finalement la toxicité du AlCl₃-SPC sans irradiation fut aussi étudiée.

Nos contrôles nous indiquaient qu'aucun de ces paramètres affectaient la survie cellulaire tandis que l'efficacité d'inoculation variait entre 80 et 100%.

1.2.3. SOURCE D'IRRADIATION

1.2.3.1. MONTAGE

Nos cellules étaient irradiées pendant 4 minutes par un projecteur à diapositive (Kodak Ektagraphic) contenant une lampe tungsten/halogen de 500 W , les lentilles convergentes et le filtre coupe chaleur de Kodak et un filtre rouge (Corning #2418). Ce dernier éliminait la lumière de longueur d'onde inférieure à 590 nm.

1.2.3.2. DOSE D'IRRADIATION

La dose d'irradiation se calculait en tenant compte des caractéristiques et les limites du système irradiation - détecteur utilisé qui étaient.

1- Notre photomètre (Li-Cor, Li-185B) nous donnait une lecture en microEinsteins $M^{-2} \text{ sec}^{-2}$; en d'autres termes il nous renseignait sur le débit de photons émis par la lampe. En tenant compte du filtre rouge et des limites de captation de la sonde (400 - 700 nm), notre lecture représentait donc l'émission entre 590 et 700 nm.

2- Le spectre d'émission de la lampe avec le filtre n'était pas linéaire dans cet intervalle de longueur d'onde.

3- La lumière émise n'était pas toute potentiellement photoactive. On estimait en effet que seul la forme monomérique du AlCl-SPC était active et que son pic d'absorption dont le maximum était à 674 nm s'étendait majoritairement de 650 à 690 nm. Toute lumière émise à toute autre longueur d'onde n'était pas photoactive et surestimait la dose d'irradiation.

4- L'énergie d'un photon variait en fonction de sa longueur d'onde.

La dose d'irradiation dont le calcul complet se retrouve à l'annexe 3 était de $100 \text{ J/m}^2\text{sec}$.

1.3. DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DES AlCl-SPC

1.3.1. INTENSITE DE FLUORESCENCE

Le potentiel de fluorescence ainsi que l'uniformité d'émission des

trois fractions de AlCl₃-SPC a été évalués de la façon suivante. Les phthalocyanines (0.25 à 50 μ M) étaient tout d'abord mis en solution dans 100% méthanol afin d'éviter leur agrégation, puis leur émission de fluorescence était mesurée grâce à un fluorimètre Carl Zeiss ajusté de la façon suivante: λ_{ex} =370 nm et λ_{em} =690 nm. Ces résultats nous permettront de juger de la pertinence des comparaisons entre les divers AlCl₃-SPC.

1.3.2. MICROSCOPE A FLUORESCENCE

Ces expériences ont été inspirées de celles effectuées par Chan et al. (1986) ainsi que de Austen et al. (1978), avec quelques modifications. Des cellules V-79 (10⁶) étaient inoculées dans une boîte de pétri de 60 mm de diamètre et incubées avec le milieu MEM complet durant 10 h afin de permettre aux cellules de s'adhérer et de bien reprendre leur forme fibroblastique. Après deux lavages au PBS, elles étaient incubées pendant 0.25 à 24 h dans le noir avec 0.01 à 100 μ M du photosensibilisateur en solution dans du milieu OPTI-MEM additionné de 1% sérum.

Après avoir retiré la solution de photosensibilisateur, les cellules étaient rincées 2 fois avec du PBS, fixées pendant 30 sec avec de la formaline 10% et rincées une dernière fois avec du PBS. Une lamelle de 24x30 mm était ensuite installée dans le pétri à l'aide de PBS puis les cellules étaient observées au microscope à fluorescence (Leitz Wetzlar). Le microscope était réglé à un grossissement de 540x et équipé des filtres d'excitation UV UG 1 lmm, blue BG 38 3mm ainsi qu'avec un diffuseur et un filtre K 530 qui servait à éliminer la

lumière de longueur d'onde inférieure à 530 nm.. Les photographies étaient prises sur un film Kodak TRI-X PAN 400 ASA.

Dans le cas du disulfoné AlCl-SPC, des études de cinétique ont été effectuées. La concentration et le temps d'incubation optimales furent de 50 μ M de 24 h. Les mêmes conditions étaient donc utilisées pour le reste de l'étude avec les autres fractions.

2. ANTICORPS MONOCLONAL

2.1. HYBRIDATION

L'hybridome résultant de la fusion entre le plasmocyte et le myélome était un cadeau du Dr. Nigam du département de biologie cellulaire au CHUS. Le développement du plasmocyte fut effectué en injectant des cellules cancéreuses adénocarcinome mammaire 13762 (MAC) de rat Fischer femelle 344/CRBC chez la souris Balb /c femelle.

2.2. CULTURE IN VITRO

Les hybridomes étaient cultivés à 37°C dans un incubateur contenant 5% CO₂. Au milieu de culture DMEM, on a ajouté 0.35% dextrose, 0.37% bicarbonate de sodium, 2% pénicilline G, 2% streptomycine sulfate, 5% milieu NCTC, 10% sérum de foetal bovin, 0.5% vitamine 100x et 0.5% d'acides aminés non-essentiels. Lors des passages, les cellules étaient décollées du fond de la boîte simplement en y projetant le vieux milieu de culture à l'aide d'une pipette pasteur. Ensuite, les hybridomes étaient centrifugés puis resuspendus dans du nouveau milieu. Environ 10⁶

hybridomes étaient inoculés dans les nouvelles boîtes (25 cm²)

2.3. CULTURE IN VIVO

La culture in vivo s'effectuait comme décrit dans Brodeur et al. (1984). L'hybridome provenant d'un plasmocyte et d'un myélome de souris Balb/c femelle, ce même animal fut utilisé pour la culture in vivo. Après avoir prétraitée celle-ci avec 0.5 ml de pristane (2,6,10,16 tétraméthylpentadécane) pendant 10 à 14 jours, 10⁶ hybridomes étaient injectés dans la cavité abdominale. Deux semaines plus tard, le fluide ascétique s'étant formé, il était récolté à l'aide d'une aiguille à perfusion (26 G 1/2). La production de fluide persistait durant de 4 à 5 jours et de 6 à 10 ml étaient obtenus par souris.

2.4. PURIFICATION

2.4.1. COLONNE D'HYDROXYLAPATITE

La purification s'effectuait essentiellement selon la méthode de Stanker et al. (1985). Une fois le fluide ascétique récolté, l'anticorps était précipité en saturant la solution à 50% d'ammonium sulfate. Après une incubation à 4⁰C pendant 1 h, le précipité était centrifugé à 2000 g pendant 20 min puis resuspendu dans un volume minimal de PBS, filtré sur ouate et dessalé sur une colonne G-25 (10 ml). L'élution était détectée via une lecture de densité optique à 280 nm, et les fractions contenant l'anticorps étaient combinées puis appliquées sur une colonne d'hydroxylapatite.

La colonne (hauteur de gel 18.5cm, rayon 2.5 cm) était éluée à un

débit de 1.0 ml par min à l'aide d'une pompe peristaltique (Buchler instruments) tandis que les échantillons étaient séparés via un collecteur de fractions (LKB 7000) à tous les 4.0 ml. L'élution de l'anticorps s'effectuait grâce à un gradient de sodium phosphate (0.01 à 0.3 M) et était suivie via une lecture de densité optique à 280 nm. Un test ELISA nous indiquait le pic d'élution correspondant à l'anticorps monoclonal tandis qu'une lecture de conductivité, en utilisant une courbe standard de 0.01 à 0.4 M phosphate, nous permettait de suivre le gradient (conductivimètre YSI modèle 31).

2.4.2. ELECTROPHORESE

La détection des chaînes lourdes et légères de notre McAb a été obtenue par une électrophorèse SDS-PAGE. Préparé la veille, le gel à pH 8.8 était constitué de 8% acrylamide, 0.6% N,N-methylene bisacrylamide, 0.2% SDS, 1.4% tris-base, 1.72 ml HCl 6N, 0.125% ammonium persulfate et 0.045% temed. Nos échantillons étaient préparés dans 10% glycérol, 0.4% SDS, 0.01% bleu de bromophénol, 0.002% mercaptoéthanol et 1.25% d'un tampon pH 6.8 constitué de 6.36% tris-base, 0.5% SDS et 0.5% HCl 6N. La quantité de protéine par échantillon variait de 20 à 60 µg et des contrôles de BSA (Sigma A-4503) ainsi que de IgG (Bio-Rad 500-0005) furent utilisés. Le tout était chauffé à 100°C pendant 2 min puis 35 µl d'échantillon ont migré par puit en appliquant pendant 20 min 100 mA suivi d'une diminution à 40 mA maintenu jusqu'à ce que l'indicateur bleu de bromophénol atteigne le bas du gel. Le tampon d'électrophorèse pH 8.8 utilisé était constitué de 0.3% tris-base, 1.4% glycine et 0.1% SDS.

La fixation et la coloration du gel s'effectuaient en deux étapes.

Premièrement, le gel était placé pendant 1 h à 37 °C dans une solution contenant: 45% de méthanol, 10% d'acide acétique glacial et 0.25% de brillant bleu G. Ensuite, le gel a été décoloré à l'aide d'une solution contenant 7.5% de méthanol et 5% d'acide acétique glacial renouvelé au moins à deux reprises.

2.4.3. CHROMATOGRAPHIE SUR HPLC

Afin de vérifier le niveau de pureté de l'anticorps monoclonal isolé par l'hydroxylapatite, une élution sur HPLC a été effectuée. La colonne Superose 12 (Pharmacia) fut utilisée à un débit de 0.4 ml par min et éluée avec un tampon phosphate 0.05 M additionné de 0.15 M chlorure de sodium. L'appareillage était complété par un détecteur UV (254 nm).

2.5. CARACTERISATION DU McAb

2.5.1. MONOCLONALITE

La monoclonalité de notre anticorps fut vérifiée grâce à un point isoélectrique de ses chaînes légères tel que décrit dans Talbot et al.(1985).

2.5.1.1. INCORPORATION DE LA LEUCINE-C¹⁴

Le marquage des chaînes légères s'effectuait de la façon suivante. Des hybridomes en phase de croissance exponentielle (10^5) et d'une viabilité d'au moins 90% furent déposés dans un tube eppendorf de 1.5 ml, lavés avec du milieu de culture sans leucine, resuspendus et incubés

2 h (37^0C et 10% CO_2). Les cellules étaient ensuite centrifugées à 200 g pendant 3 min puis incubées de 4 à 8 h dans 0.1 ml du milieu de culture contenant 1 μCi de leucine- C^{14} . Ensuite, 0.1 ml de milieu complet a été ajouté et incubé de 12 à 16 h. Finalement, après une centrifugation à 8800 g pendant 2 min, les hybridomes étaient lavés 3 fois avec 0.1 ml PBS. Les surnageants furent conservés.

2.5.1. PURIFICATION, REDUCTION ET ALKYLATION DES IMMUNOGLOBULINES

MARQUEES AU C^{14}

Suite au marquage, les chaînes légères obtenues furent isolées et stabilisées. Pour ce faire 0.3 ml (3.5 M ammonium sulfate, pH 7.3) fut ajouté aux surnageants précédemment obtenus et incubé pendant 30 min à 4^0C . Après une centrifugation à 8800 g (15 min), le culot était resuspendu dans 0.2 ml PBS et reprécipité avec 0.2 ml de 3.5 M ammonium sulfate qu'on incubait 30 min à 4^0C . Le nouveau précipité était ensuite centrifugé comme précédemment et le culot d'anticorps marqué resuspendu dans 0.2 ml d'un tampon urée (0.8 M urée, 0.2 M tris-HCL pH 8.2, 1 mM EDTA et saturé d'azote gazeux juste avant l'utilisation). Les ponts bisulfures reliant les chaînes lourdes aux légères furent coupés en effectuant une réduction à 37^0C pendant 30 min avec 20 μl de dithiothreitol (DTT) (15 mg/ml dans le tampon urée). Les groupements thiols étaient ensuite protégés par une alkylation à 37^0C pendant 30 min en ajoutant 20 μl d'iodoacetamide (40 mg/ml dans le tampon urée). L'excès d'iodoacétamide était éliminé en ajoutant par la suite 20 μl de dithiothréitol (DTT). Les chaînes stabilisées ont été précipitées avec 0.5 ml méthanol et incubé de 2 à 24 h à 20^0C . Après une centrifugation à 8800 g pendant 15 min, le culot était resuspendu dans 20 μl du tampon

d'échantillon (8M urée, 0.05M d'acide formique, 0.01 M NaOH, 5% glycérol, pH 4.0 et ajouté du méthyl vert). Notez que ces échantillons étaient calibrés pour avoir 20 000 CPM par 10 μ l.

2.5.1.3. ELECTROPHORESE D'UREE - FORMATE ET POINT ISOELECTRIQUE

Les chaines légères étaient séparées des lourdes par électrophorèse d'urée - formate à pH 3.0. La composition du gel était la suivante: 7.5% d'acrylamide, 0.2% N,N-méthylène bisacrylamide, 8 M d'urée, 0.05M d'acide formique, 0.01% NaOH, pH 3.0, 0.1% ammonium persulfate et 0.2% TEMED. Le gel devait être préparé de 6 à 24 h avant l'utilisation afin d'assurer des résultats reproductibles. Un système d'électrophorèse verticale LKB 2001 était utilisé avec un tampon constitué de 0.05 M d'acide formique, 0.01 M NaOH, pH 3.0. Après le conditionnement du gel à 100 V pendant 3 h, 10 μ l d'échantillon était ajouté en double et l'électrophorèse s'effectuait à 10⁰ C et 2200 Vh pendant toute la nuit. Une moitié du gel était coloré avec le bleu de coomassie (60⁰C, 10 min) et décoloré pendant 10 min. En comparant la moitié du gel coloré avec l'autre, la position des chaines légères était déterminée et la bande de gel correspondante découpée et transférée immédiatement sur le gel de point isoélectrique (PI) constitué de: 6% acrylamide, 0.1% N,N-méthylène bisacrylamide, 6 M urée, 2% biolyte pH 3-10, 0.5 μ g/ml riboflavine. Ce dernier composant servait à polymériser le gel à l'aide d'une lumière fluorescente allumée pendant toute la nuit.

La bande de gel d'urée - formate était placée à 2 cm de l'anode et le gel PI était recouvert de "white petrolatum" (45⁰C). Une bande de 0.7 cm de large du petrolum (solide) était ensuite enlevée à chaque

extrémité du gel où les électrodes étaient appliquées (1 M NaOH et 1 M H_3PO_4).

L'électrophorèse était mise en marche à 10^0C pour la nuit à 1300 V, 20 mA et 10 W. Le gel était ensuite fixé et coloré à 70^0C avec 20% TCA et 0.005% de bleu de coomassie pendant 30 min puis lavé avec 1 litre d'eau renouvelé pour la nuit. Le gel était finalement enduit avec 1% glycérol pendant 1 h puis séché (Bio - Rad model dryer) avant d'être exposé sur du papier Kodak XAR-5 durant une journée à 2 semaines pour compléter l'autoradiographie.

2.5.2. CLASSE ET SOUS-CLASSE

L'identification du McAb a été effectué en utilisant un kit vendu par Calbiochem (cat. no 386 445). Les McAb étaient d'abord fixés sur la plaque d'ELISA en chlorure de poly-vinyle (Flow lab. no cat. 77-173-05) en pipettant 10 μl d'anticorps fraîchement purifié et incubé à 25^0C pendant 2 h. Les sites de liaison non spécifiques étaient ensuite saturés à l'aide d'une solution 0.2% BSA incubée à 4^0C pendant toute la nuit. La plaque était ensuite lavée à 2 reprises par immersion dans un bain de PBS contenant 0.2% de BSA, puis deux gouttes des différents anti-anticorps spécifique à une classe d'immunoglobuline étaient ajoutées dans le puit correspondant et 0.2% BSA dans les contrôles. Après une incubation de 2 h à 25^0C , la plaque était lavée 2 fois et 100 μl d'un anti-anti-anticorps conjugué à la peroxydase et dilué 1:4000 avec du PBS (0.2% BSA) était ajouté. Ce dernier anticorps servait à détecter les anticorps spécifiques à une classe d'immunoglobuline liés au McAb. Après une incubation pendant 1 h, la plaque était lavée à 3 reprises et

on ajoutait 100 μ l de substrat enzymatique préparé en diluant (10x) le concentré et en y dissolvant 2 tablettes de "chromaphore". L'incubation dure 30 min et la réaction enzymatique était arrêtée avec 50 μ l 1 N HCl. Les lectures de densité optique étaient finalement effectuées à 490 nm.

Deux types de contrôles étaient utilisés. L'un où l'on ne mettait pas l'anti-anticorps spécifique à une classe d'immunoglobuline, et le deuxième où le McAb était lui aussi retiré.

2.5.3. SPECIFICITE IN VITRO

Un test ELISA a été effectué afin d'évaluer la spécificité in vitro du McAb (Bigbee et al., 1983; Stocker et Heusser, 1979). Ce test se divisait en deux principales étapes: a) les cellules étaient tout d'abord fixées sur la plaque ensuite, b) le McAb était ajouté puis sa liaison avec l'antigène était détectée à l'aide d'une réaction enzymatique (peroxidase ou β -galactosidase).

La fixation des cellules s'effectuait de la façon suivante. Dans chaque puit de la plaque ELISA, 50 μ l de poly-L-lysine 0.05% (Sigma P 1399) était pipeté puis incubé 30 min à 25⁰C. La plaque était ensuite renversée et secouée vigoureusement pour enlever l'excès de poly-L-lysine. Les cellules (50 μ l) étaient ensuite ajoutées en quantité suffisante pour recouvrir le fond du puit, soit:

<u>Cellules</u>	<u>Nombre</u>
MAC	2 x 10 ⁵
Globules rouges	2 x 10 ⁶

Foie	1×10^6
V-79	2×10^5

Après ce pipettage, les cellules étaient centrifugées à 2000 g pendant 10 min à l'aide de support spéciaux (Cooke Laboratory products no cat. 1-220-84) puis fixées en ajoutant, délicatement, 100 μ l de glutaraldéhyde 0.025% en solution dans du PBS à 4°C. Après avoir incubé pendant 30 min, la plaque était renversée, secouée puis chaque puits étaient remplis avec une solution 3% BSA (Sigma ELISA grade A 7030) qui après une incubation de 3 h saturait les sites de liaison non spécifiques.

Afin de détecter la présence de l'antigène, 100 μ l de McAb dilué (10^{-2} à 10^{-10}) dans une solution PBS 3% BSA étaient pipetté et incubé 2 h à 25°C. La plaque était ensuite lavée 3 fois dans 0.2% BSA et incubée pendant 2 h avec 100 μ l d'anti-anticorps-peroxidase 0.01% pipetté dans chacun des puits (Boehringer Mannheim Biochemicals no cat.821 489). Après 5 lavages, 150 μ l du substrat enzymatique était ajouté (10 ml tampon citrate 0.1 M pH 4.5, 10 mg 1,2 dihydrochlorure de phenylenediamine et 4 μ l H₂O₂ 30%) et incubé dans le noir de 0.5 à 2 h selon le développement de la couleur. La réaction enzymatique était finalement arrêtée en ajoutant 50 μ l d'acide sulfurique 1 M, et le surnageant coloré était finalement transféré dans de nouveaux puits dont la densité optique était lue à 490 nm.

Avec les cellules de foie et les globules rouges, la peroxidase in situ provoquait un niveau de bruit de fond trop élevé. On a donc eu recours à un autre traceur enzymatique soit la β -galactosidase (Amersham

no cat. N 831) diluée 2000x dans du PBS contenant 10 mM MgCl₂ et 1 mM mercaptoéthanol. Son réactif enzymatique était le suivant: 3 mM ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside dilué dans un tampon PBS additionné de 10 mM MgCl₂ et 0.1 M mercaptoéthanol. Ce dernier était ajouté juste avant l'utilisation. Une fois la coloration développée, la réaction était arrêtée avec 50 μ l 1 M Na₂CO₃.

Les globules rouges étaient isolés à partir de sang prélevé chez le rat Fischer femelle. Celui-ci était centrifugé à 2000 g et lavé 2 fois au PBS. Pour ce qui était des cellules du foie, l'organe était d'abord coupée en petits morceaux puis le sang était imbibé le plus possible à l'aide d'un gaze GR 50. Une population cellulaire très hétérogène émergeait ensuite de la trypsinisation de ces morceaux de foie qui s'effectuait en incubant (15 min) sous agitation avec 1 à 2 ml de trypsine 0.25%. La trypsine était éliminée en lavant deux fois avec du PBS. Le procédé fut repris jusqu'à temps d'avoir le nombre requis de cellule.

Divers contrôles étaient utilisés pour vérifier la validité de ce test ELISA. Premièrement, aux cellules testées, l'anti-anticorps-enzyme était ajouté avec le substrat et deuxièmement, seul le substrat était ajouté aux cellules. A l'occasion, l'activité de l'enzyme était vérifiée de la façon suivante: le McAb dilué (PBS) était directement fixé dans les puits, additionné d'anti-anticorps-enzyme et ensuite du substrat. Chacun de ces contrôles confirmaient la validité des résultats obtenus.

2.5.4. NOMBRE D'ANTIGENES PAR CELLULE TUMORALE ET CONSTANTE

D'ASSOCIATION

Afin de vérifier le potentiel in vitro de notre anticorps, le nombre d'antigènes présent sur la surface des cellules tumorales fut mesuré ainsi que la constante d'association entre le McAb et son antigène. Pour effectuer ces déterminations, l'anticorps fut marqué à l'iode 125 et un test d'immunoréactivité a servi à vérifier si ce marquage affectait la liaison McAb-antigène.

2.5.4.1. MARQUAGE A L'IOIDE 125

L'anticorps était marqué à l'aide de l'iodogen enduit sur la paroi d'un vial en verre de 20 ml (Haisma et al., 1986). Ce traitement du vial s'effectuait en évaporant 2 ml (50 µg /ml) d'iodogen mis en solution dans du chloroforme. La capacité oxydative de l'iodogen était ensuite vérifiée en ajoutant dans un vial témoin quelques gouttes de KI (0.1 M). Ce dernier devrait virer au jaune à cause de la formation de I₂.

Une fois le vial préparé, 0.1 mg de McAb était marqué avec 1 mCi d'iode 125 dans 1 ml de tampon borate (0.1 M, pH 8.3). Durant l'incubation qui durait 10 minutes, le vial était agité au 30 sec. La réaction terminée, le McAb-I¹²⁵ était purifié par centrifugation à 850 g sur une colonne G-50.

2.5.4.2. PURIFICATION PAR CENTRIFUGATION SUR G-50

L'iode libre du McAb marqué était séparé en utilisant la méthode suivante. Après hydratation pendant 3 h dans du PBS, 0.8 ml de gel G-50 était déposé dans une seringue de 1.0 ml dont la sortie était partiellement obstruée avec de la ouate. Les sites non spécifiques du

gel étaient saturés avec 5 ml d'une solution BSA (20 mg/ml) puis l'excès était enlevé en y éluant du PBS (10 ml). Le volume mort de la colonne était retiré par une centrifugation à 850 g pendant 2 min juste avant son utilisation. Finalement, 100 à 200 μ l du mélange réactionnel y était appliqué et centrifugé comme précédemment. La méthode était rapide, efficace et n'amenait aucune dilution du McAb.

2.5.4.3. RENDEMENT DE MARQUAGE ET DE PURIFICATION

10 μ l du mélange réactionnel était prélevé avant et après la purification et déposé dans un tube eppendorf 1.5 ml. Des volumes de 100 μ l 1% BSA et 1 ml de TCA 25% étaient ajoutés et le tout agité au vortex puis incubé à 4⁰C pendant 1 h. Le surnageant et le culot étaient ensuite séparés à l'aide d'une microcentrifuge IEC modèle MB (5 min) et comptés avec un compteur gamma LKB 1282. Le rendement de marquage se situait entre 75 et 85 % tandis que le rendement de purification était de 92 à 98%.

2.5.4.4. IMMUNOREACTIVITE

Cette mesure d'immunoréactivité servait à vérifier si le marquage à l'iode 125 affectait la capacité de liaison de l'anticorps sur les cellules MAC.

Cette détermination était obtenue en appliquant la loi d'action de masse:

$$[B] = K_a [F][T - B] \quad \# 1$$

où K_a : Constante d'association

$[B]$: Concentration d'anticorps lié

[F] : Concentration d'antigène libre

[T - B] : Concentration d'anticorps libre

T: Quantité total d'anticorps appliquée

Si seulement une fraction "r" de l'anticorps était immunologiquement réactive, la concentration d'anticorps actif libre devient alors:

$$[rT - B]$$

et l'équation # 1 s'écrit

$$[B] = K_a [F] [rT - B] \quad \# 2$$

qu'on transforme pour avoir

$$\frac{[T]}{[B]} = \frac{1}{r} + \frac{1}{rK_a [F]} \quad \# 3$$

En travaillant avec un excès d'antigène le rapport $1/rK_a [F]$ tend alors vers zéro et l'équation # 3 devient:

$$\frac{[T]}{[B]} = \frac{1}{r}$$

Pour obtenir cette dernière relation, le graphe de $[T]/[B]$ est tracé en fonction de $1/[F]$ et donnera une ligne droite où l'origine sur l'ordonné représente l'excès d'antigène à l'infini. La valeur de $[T]/[B]$ correspondante nous donne alors $1/r$ qu'on inverse pour obtenir la fraction d'anticorps immunoréactive.

2.5.4.4.1. PRODEDURE EXPERIMENTALE

Le test d'immunoréactivité (Lindmo et al., 1984) s'effectuait en commençant par saturer des tubes eppendorf 1.5 ml avec 3% BSA pendant 2

h. Cette solution était ensuite retirée et de 0.1 à 2×10^6 cellules MAC (1 ml 1% BSA) était ajouté ainsi que la quantité nécessaire d'anticorps afin d'obtenir environ 30 000 cpm par tube. Après une incubation de 4 h à 4°C dans un bain rotatif (PS Dubnoff), les tubes étaient agités au vortex (vitesse minimale au 30 min). Ces tubes étaient ensuite centrifugés pendant 5 min avec la microcentrifuge puis finalement les surnageants et les culots étaient séparés et comptés. Notez que cinq points étaient déterminés par test et effectués en triplicata.

La comptabilisation des résultats s'effectuait en portant en graphique le ratio corrigé du total de McAb appliqué /quantité de McAb lié en fonction de 1/nombre de cellules. Ce ratio corrigé s'obtenait en tenant compte du bruit de fond et du niveau de purification du McAb- I^{125} . Ce dernier point était important puisque l'iode libre augmentait faussement les comptes recueillis dans le surnageant. Donc

$$\frac{\text{Total de McAb appliqué}}{\text{McAb lié}} \quad \text{corrigé} =$$

$$\frac{[(\text{compte du culot} + \text{compte du surnageant} - 2 \times \text{bruit de fond}) \times \text{rendement de purification}]}{(\text{compte du culot} - \text{bruit de fond})}$$

N.B. L'effet des liaisons non spécifiques fut négligé puisque leur niveau était très près de celui des erreurs expérimentales.

2.5.4.4.2. LIAISON NON SPECIFICITE

Ce test avait pour but de vérifier si la liaison observée entre l'anticorps et la cellule était réellement spécifique. Pour ce faire,

des tubes eppendorf étaient saturés comme précédemment et additionnés de 10^6 cellules MAC dans 1 ml 1% BSA. Les sites de liaison spécifique étaient ensuite saturés en additionnant 50 μ g de McAb froid incubé pendant 2 h à 4 °C. Le McAb marqué (0.25 à 0.01 μ g/ml) était ensuite ajouté et incubé pendant 4 h à 4 °C. Finalement, les tubes étaient centrifugés, le surnageant et le culot séparés et comptés. Neuf déterminations étaient effectuées en triplicata à des concentrations variable de McAb marqué.

2.5.4.5. DETERMINATION DU NOMBRE D'ANTIGENES PAR CELLULE CIBLE ET DE LA CONSTANCE D'ASSOCIATION

Après avoir saturés les tubes eppendorf pendant 2 h avec 3% BSA, 1.0×10^6 cellules dans 1 ml 1% BSA était ajoutées ainsi que 0.25 à 0.001 μ g/ml de McAb- 125 I (1% BSA). L'incubation s'effectuait comme précédemment (voir 2.5.4.4.1). Les tubes étaient ensuite centrifugés puis les surnageants des culots étaient séparés et comptés.

Ensuite, un graphe de type Scatchard était tracé en portant le rapport McAb lié/McAb non lié en fonction de la quantité de McAb lié où l'intercepte sur l'abscisse correspondait à la quantité maximale de McAb liée sur 1.0×10^6 cellules. En pratique

McAb lié = compte dans le culot

McAb non lié = compte dans le surnageant

Cependant, deux corrections devaient être apportées, car l'efficacité de purification du McAb- 125 I n'était pas 100% ainsi que

l'immunoréactivité. Ces deux facteurs surestimaient la quantité de McAb non liée et devaient être corrigés de la façon suivante:

$$\text{McAb non lié} = [(\text{compte du culot} + \text{compte du surnageant}) \times \text{efficacité de purification} \times \% \text{ d'immunoréactivité}] - \text{compte du culot}$$

Pour ce qui était de la constante d'association, elle s'obtenait simplement en déterminant la pente négative du graphe précédemment tracé. Neuf déterminations en triplicata étaient ici effectuées.

2.5.5. SPECIFICITE IN VIVO

Dans le but de vérifier si notre anticorps était aussi un bon transporteur in vivo, sa distribution chez le rat Fischer femelle 344/CRBL (125 gr \pm 4) fut étudiée. La tumeur était obtenue en injectant de façon intradermique 10^6 cellules MAC dans la jambe droite. Après une incubation de 5 jours, quatre groupes de trois rats étaient formés et injectés dans une veine de la queue avec 400 μ l d'une solution contenant 6 μ Ci de McAb marqué (2 μ g) ainsi qu'une concentration de McAb froid de 0, 3, 6 ou 9 μ g/gr de rat. Le volume d'injection était complété avec du PBS. Après 3 jours d'attente, les rats étaient dissectés et le coeur, estomac, foie, petit intestin, muscle, rate, rein, sang et tumeur étaient prélevés, pesés et comptés à l'aide du compteur gamma LKB 1282.

Notez que le marquage à l'iode 125 ainsi que la mesure d'immunoréactivité ont été faits comme décrit dans la précédente

section.

3. STATISTIQUE

Le traitement statistique employé lors de nos études était fort simple. La moyenne de nos déterminations était exprimé ainsi que l'écart-type qui en découlait, sauf pour les courbes de survie cellulaire où l'erreur standard à la moyenne était représentée.

Le rejet d'une donnée s'effectuait de la façon suivante. On plaçait sur le graphique la moyenne des données afin de déterminer l'allure générale de la courbe, puis toutes les données individuelles étaient ajoutées. La validité des données qui semblaient s'éloigner de la courbe était vérifiée à l'aide du test de Chauvenet. Une valeur était significativement valide si elle tombait dans l'intervalle déterminé par:

$$\text{moyenne} \pm K\sqrt{\text{moyenne}}$$

où K variait en fonction du nombre de détermination. Dans notre cas il avait la valeur de:

Nombre de détermination	K
3	1.38
4	1.54
5	1.65
6	1.73
7	1.80
8	1.86
9	1.91

Notez qu'il était très important de vérifier d'abord la validité de la détermination sur le graphique. Avec les courbes de survie, des pentes parfois très abruties étaient obtenues (voir fig. 2) où un écart supérieur à ceux obtenu par le test de Chauvenet serait expérimentalement justifié.

RESULTATS

Dans un but schématique, on a disposé les résultats en deux principales parties soit ceux relatifs aux phthalocyanines puis à l'anticorps monoclonal.

1. PHTHALOCYANINE

Avant d'étudier le potentiel photocytotoxique d'un complexe McAb - phthalocyanine, on doit en connaître le plus possible sur le mode d'action de la drogue pour ne pas inhiber son activité en la liant sur le transporteur. On sait que l'oxygène singulet est impliqué, mais l'identité des sites intracellulaires touchés est inconnue. On a donc établi le lien entre l'efficacité photocytotoxique, l'hydrophobicité et la distribution intracellulaire. A cette fin, des tests de photocytotoxicité et des études au microscope à fluorescence ont été exécutés.

1.1 EFFET DU DEGRE DE SULFONATION SUR LEUR EFFICACITE PHOTOCYTOTOXIQUE

Comme mentionné précédemment dans "matériel et méthodes", deux tests de photocytotoxicité furent exécutés. Dans le premier, les cellules V-79 sont incubées pendant 1 h avec des concentrations des divers AlCl-SPC variant de 0.25 à 50 μ M suivie d'une irradiation pendant 4 min avec la lumière rouge. L'effet photocytotoxique enregistré est représenté sur la figure 1. La concentration de AlCl-SPC nécessaire pour tuer 90% des cellules (LD90) illustre bien la grande dépendance entre le degré de sulfonation des AlCl-SPC et l'effet photocytotoxique.

Ainsi le AlCl-SPC avec un rapport S/PC de 2.0 a un LD₉₀ de 1.7 μM ce qui en fait de loin le meilleur photosensibilisateur étant donné que les fractions 2.7 et 3.6 ont respectivement un LD 90 de 4.5 et 38.3 μM . La fraction 2.0 s'avère donc 25 fois plus photocytotoxique que la fraction 3.6 qui contient des tri et tetrasulfonés AlCl-SPC. Cette première fraction (2.0), composée d'isomères disulfonés hautement hydrophobes, nous permet de vérifier la relation voulant que des AlCl-SPC plus hydrophobes soient aussi plus phototoxiques.

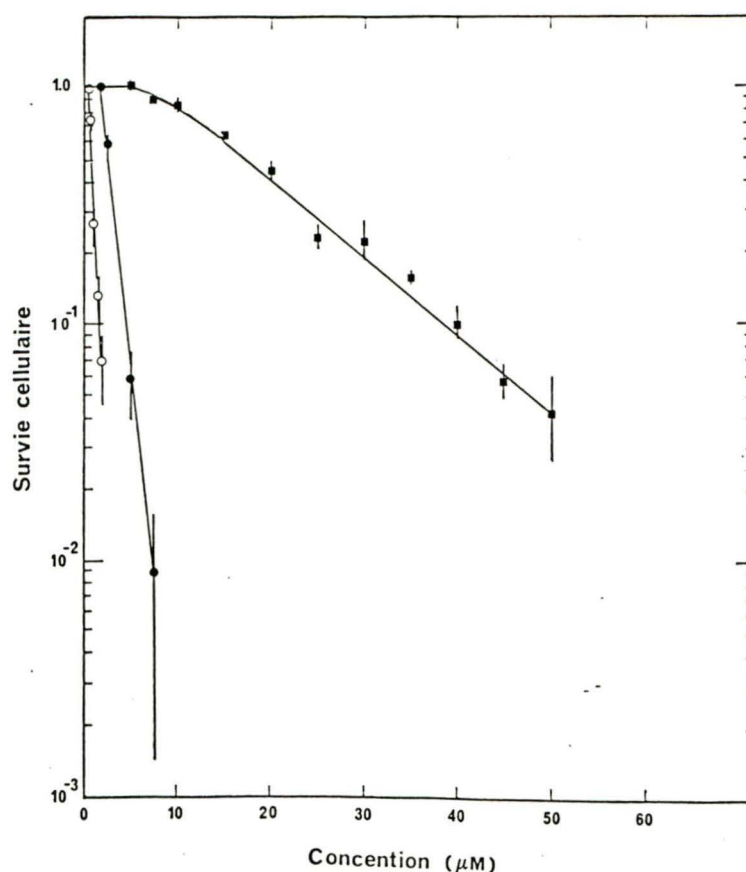


Fig. 1. Courbe de survie des cellules V-79 en fonction de la concentration de AlCl-SPC après une exposition de 4 min à la lumière rouge ($> 590 \text{ nm}$). Les symboles correspondent aux préparations de AlCl-SPC ayant un rapport S/PC de 2.0 (O), 2.7 (●) et 3.6 (■). Pour chaque point, on indique l'erreur standard de la moyenne.

Dans un deuxième temps, un autre test de photocytotoxicité est réalisé où la relation entre la capacité phototoxique et le degré de

sulfonation est encore plus marquée. Cette fois-ci, la concentration de drogue est fixée à 2 μ M alors que le temps d'incubation varie de 0.25 à 24 h. Les résultats s'expriment en "temps d'incubation requis pour tuer 90% des cellules" (LT₉₀). Une valeur de 0.6 h est enregistrée pour la fraction 2.0 (figure 2), tandis qu'avec la fraction 2.7 le temps d'incubation nécessaire est 17 fois plus élevé (LT₉₀=10.4 h). Pour ce qui est de la fraction 3.6, aucune phototoxicité significative est obtenue après 24 h.

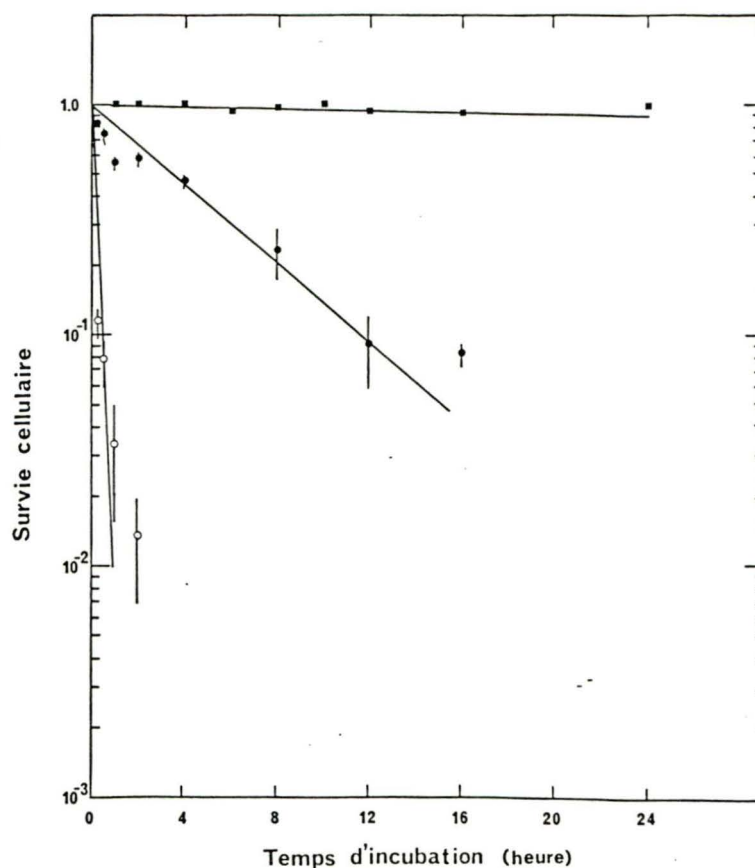


Fig. 2. Survie cellulaire des V-79 en fonction du temps d'incubation avec 2 M de AlCl-SPC. Les symboles correspondent aux préparations de AlCl-SPC ayant un rapport S/PC de 2.0 (○), 2.7 (●) et 3.6 (■). Pour chaque point, l'erreur standard de la moyenne est indiquée.

Nos divers contrôles appuient ces précédents résultats. Avec les cellules V-79 sans addition de AlCl-SPC, on observe que l'exposition à

la lumière rouge n'affecte pas la croissance cellulaire. Les mêmes résultats sont obtenus lorsque les cellules sont incubées avec 50 μ M de AlCl-SPC (rapport S/PC de 2.0 à 3.6) pendant 1 h sans exposition subséquente à la lumière rouge. Même après une période d'incubation de 24 h et 2 μ M de SPC, encore très près de 100% de survie cellulaire est enregistré.

1.2 RELATION ENTRE LA DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE ET LE DEGRE DE SULFONATION DES AlCl-SPC

L'absorption et la distribution des divers AlCl-SPC est visualisées grâce au microscope à fluorescence. Cependant, pour être comparées équitablement, les trois fractions de AlCl-SPC doivent posséder les mêmes propriétés fluorimétriques. Cette précaution s'avère d'autant plus importante qu'on prévoyait un auto-quenching (photon de fluorescence émis d'une molécule de phthalocyanine et absorbé par la molécule photosensibilisatrice voisine) de l'émission de fluorescence ($\lambda_{\text{max}}=690$ nm) étant donné son chevauchement sur le spectre d'absorption ($\lambda_{\text{max}}=674$ nm).

Un fluorimètre Carl Zeiss fut utilisé pour mesurer l'émission des trois fractions de AlCl-SPC dont la concentration variait de 1.25 à 50 μ M. Afin d'éviter les phénomènes d'agrégation qui diminuent l'émission de fluorescence ces solutions ont été préparées dans du méthanol.

Sur la figure 3, on s'aperçoit que le maximum d'intensité est obtenu entre 2.5 et 5.0 μ M. On remarque aussi qu'à cause de l'auto-

quenching l'intensité de fluorescence n'est pas proportionnelle à la concentration. Cependant, ces lectures ont été effectuées avec une cuvette de 1 cm de largeur où le parcours du rayonnement de fluorescence est beaucoup plus grand que dans une cellule (quelques μm). La probabilité d'autoquenching devrait donc être de beaucoup inférieure dans la cellule. En plus, Ben-Hur et al. (1986) ont mesuré une concentration de 0.4 nM de AlCl-SPC dans des cellules de type V-79 après une incubation de 16 h avec 25 μM de drogue. En se référant à la figure 3, l'autoquenching serait improbable à de telle concentration cellulaire de phthalocyanine. Par conséquent, ces résultats mettent en lumière le fait que les AlCl-SPC se comportent de façon identique dans un intervalle de rapport S/PC de 2.0 à 3.6 ce qui permet d'affirmer qu'on peut comparer qualitativement leur distribution cellulaire avec le microscope à fluorescence.

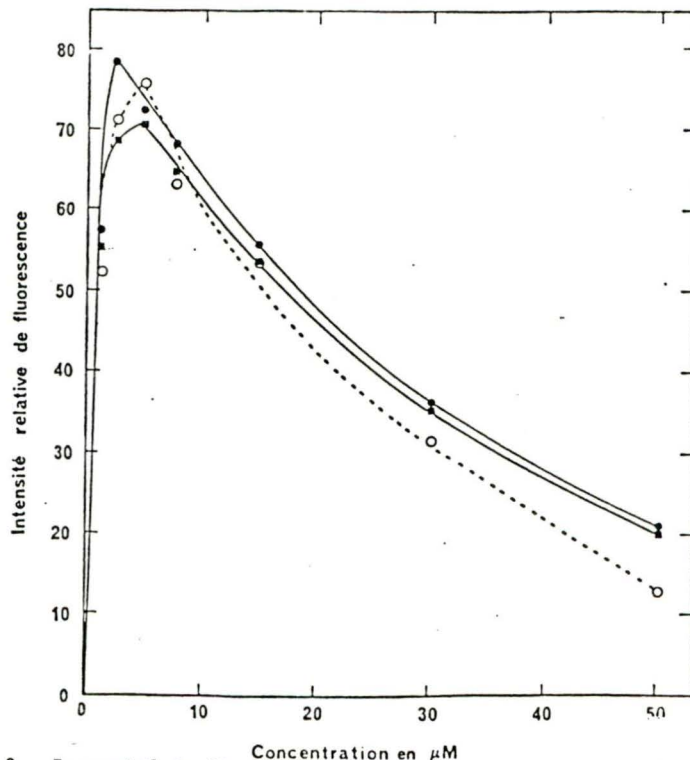
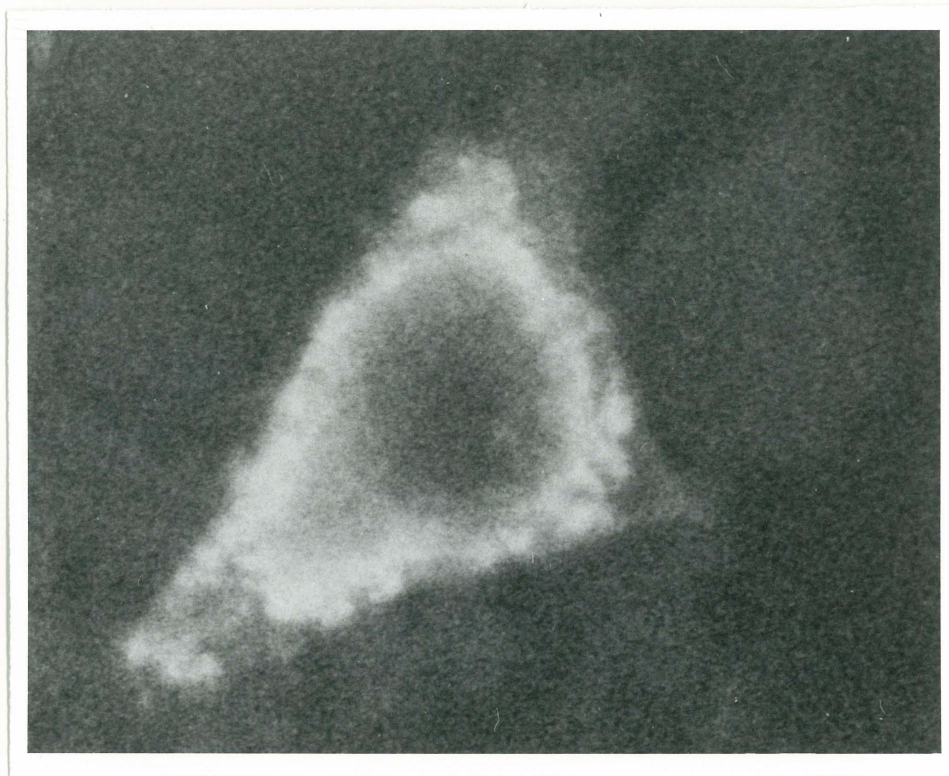
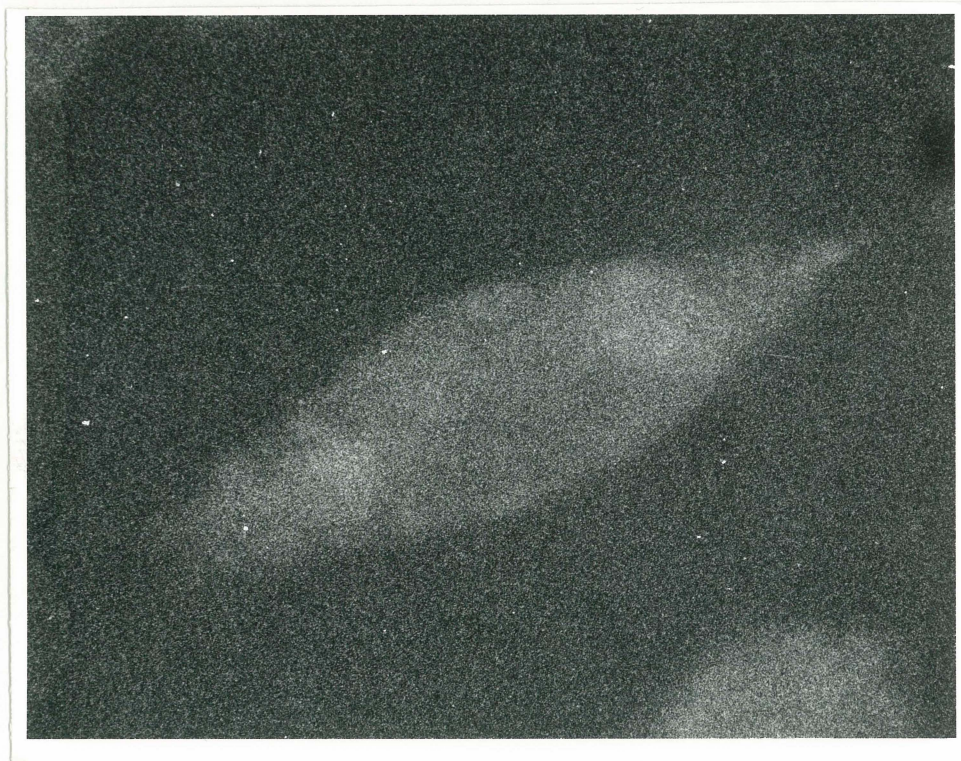


Fig. 3. Intensité de fluorescence relative mesurée à 690nm ($\lambda_{\text{ex}}=370\text{nm}$) pour les diverses préparations de AlCl-SPC. Les fractions de AlCl-SPC sont identifiées selon leur rapport S/PC avec les symboles suivants: 2.0 (O), 2.7 (●) et 3.6 (■). L'écart-type étant trop faible, on n'a pas pu le représenté de façon significative.

Les photos prises sur ce microscope nous démontrent qu'il y a très



A



B

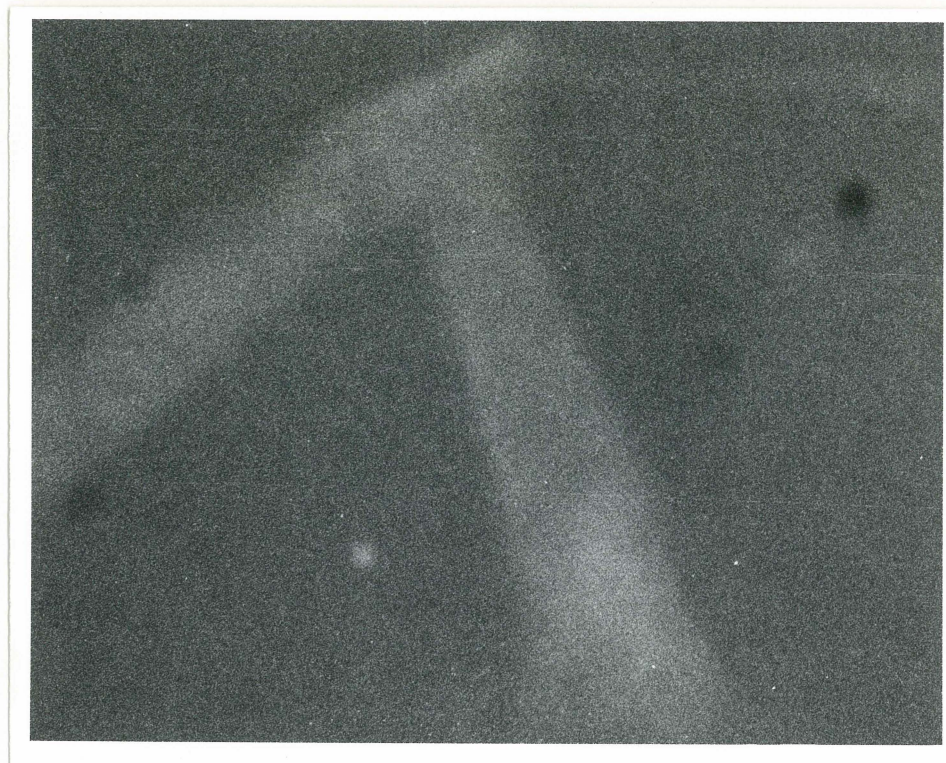


Fig. 4. Distribution cellulaire des AlCl- SPC observée au microscope à fluorescence après une incubation de 24 h avec 50 μ M des différents AlCl-SPC. L'identification selon leur rapport S/PC est: (A) 2.0 , (B) 2.7 et (C) 3.6.

peu d'absorption cellulaire avec la fraction la plus polaire (S/PC=3.6) après 24 h d'incubation à 50 μ M (figure 4 C). A l'opposé, la fraction 2.0 qui est la plus hydrophobique est absorbée fortement par la cellule et se diffuse uniformément dans le cytoplasme (figure 4 A). Pour sa part, le noyau ne contient pas de fluorescence significative.

2. ANTICORPS MONOCLONAL

Proposé comme transporteur, l'anticorps mis à notre disposition a été produit en grande quantité, purifié et caractérisé. Finalement, on a évalué son potentiel in vivo et in vitro en se servant des paramètres précédemment décrits.

2.1. NIVEAU DE PURETE

Après la phase de production *in vivo*, on a purifié notre anticorps monoclonal par une précipitation avec l'ammonium sulfate puis par une chromatographie sur hydroxylapatite. La figure 5 illustre son profil d'élution où on distingue un pic majeur correspondant à l'anticorps purifié. L'identification de ce pic a été faite grâce à différentes techniques: test ELISA, électrophorèse et analyse sur HPLC.

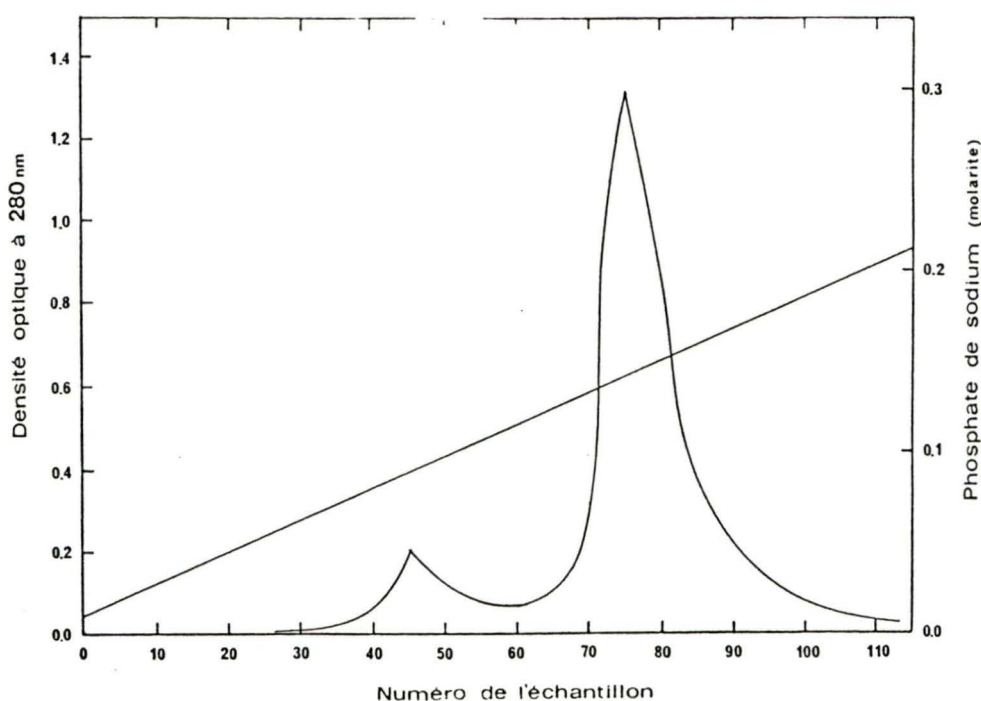


Fig. 5. Chromatographie sur hydroxylapatite de la préparation de McAb précipiter par ammonium sulfate 50%. L'élution s'effectue à l'aide d'un gradient de phosphate de sodium (0.01 à 0.3 M). On constate la présence d'un pic majeur qui s'avérera être celui du McAb.

Un exemple des résultats obtenus avec le test ELISA est représenté sur le tableau 1 où une mesure de densité optique à 490 nm nous permet de détecter la présence de l'anticorps sous le pic majeur d'élution.

TABLEAU 1

DETECTION DE LA PRESENCE DU McAb PAR TEST ELISA SUITE A SA CHROMATOGRAPHIE SUR HYDROXYLAPATITE	
No de l'échantillon	Densité optique à 490 nm
20	0.00
40	0.03
50	0.07
60	0.08
70	0.86
75	0.87
80	0.87

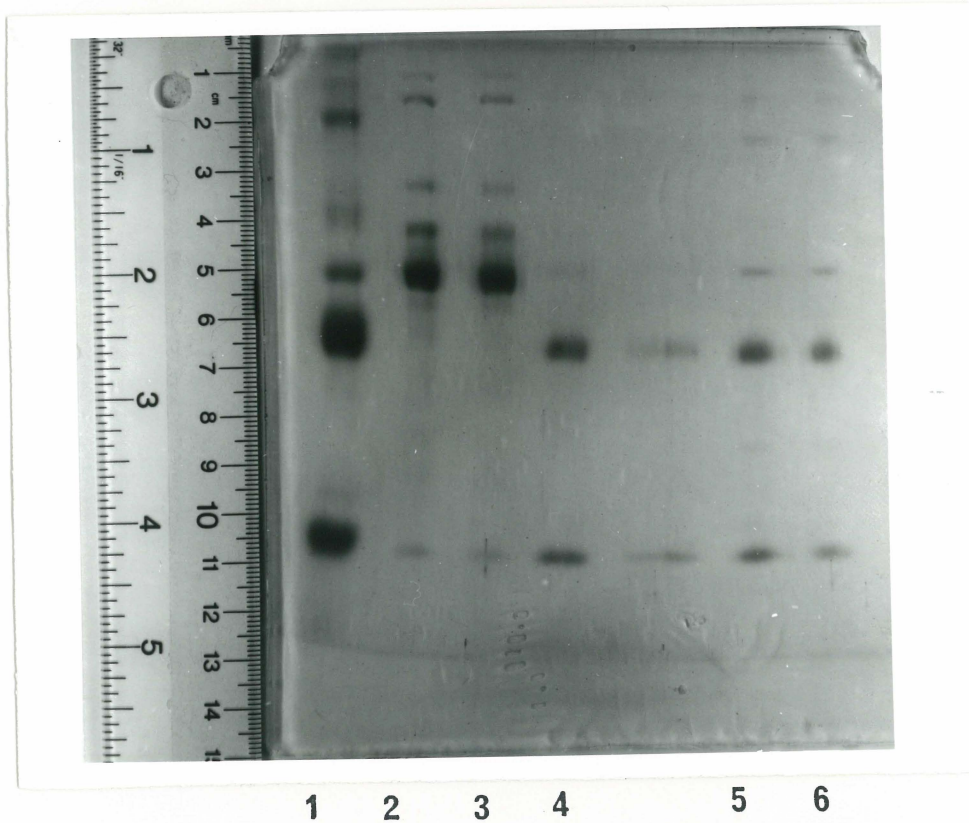


Fig. 6. Electrophorèse SDS-PAGE de notre McAb. A l'aide principalement d'un standard IgG, on constate qu'on a effectivement isolé un anticorps en observant le profil typique des chaînes protéiques lourdes et légères. Les puits correspondent à 1- IgG standard (60 μ g), 2- BSA standard (50 μ g), 3- BSA standard (25 μ g), 4- IgG standard (30 μ g), 5- McAb (40 μ g), 6- Mcab (20 μ g).

L'électrophorèse a servi à mettre en évidence le profil typique d'un IgG avec ces chaînes protéiques lourdes et légères (figure 6). On constate premièrement que les puits 1, 2 et 3 contenant les contrôles d'IgG et d'albumine ont été surchargés ce qui n'est pas le cas des puits 4, 5 et 6 représentant respectivement l'autre IgG de contrôle (mais moins concentré) et deux concentrations du McAb. Les R_F des principales bandes sont représentés sur le tableau 2 qui en parallèle avec la photographie du gel met nettement en évidence le profil typique des anticorps confirmant l'identité de notre McAb.

TABEAU 2

IDENTIFICATION DES CHAINES PROTEIQUES LOURDES ET LEGERES DE L'ANTICORPS MONOCLONAL ISOLE		
Puit	Echantillon appliqué	Principaux R_F
1	IgG standard (60 μ g)	0.38 , 0.48 , 0.82
2	BSA standard (50 μ g)	0.30 , 0.38
3	BSA standard (25 μ g)	0.30 , 0.38
4	IgG standard (30 μ g)	0.50 , 0.85
5	McAb (40 μ g)	0.38 , 0.50 , 0.85
6	McAb (20 μ g)	0.38 , 0.50 , 0.85

Cependant, on remarque une petite bande à un R_F de 0.38 similaire à celui de l'albumine et qui semble quelque peu contaminer notre McAb. Afin de mesurer l'importance de ce petit contaminant, on a élué l'anticorps sur une colonne HPLC Superose 12. Son profil d'élution (figure 7) nous indique nettement qu'on a en grande majorité l'anticorps.

2.2 PREUVE DE SA MONOCLONALITE

Nous avons un anticorps pur, mais est-il vraiment monoclonal? Ce point important fut vérifié à l'aide d'une analyse de chaînes légères

dont les résultats sont présentés sur la figure 8. Si l'anticorps est vraiment monoclonal, une seule bande de chaînes légères devrait être détectée. Notre McAb a été appliqué dans le puit no 7 dont l'analyse sur le gel de point isoélectrique nous permet de visualiser la présence d'une bande majeure à 4.7 cm de l'anode ainsi qu'une autre, mineure cette fois, à 4.1 cm. Cette dernière bande n'est pas le reflet d'une impureté, mais plutôt d'un artefact expérimental. En effet, Awdeh et

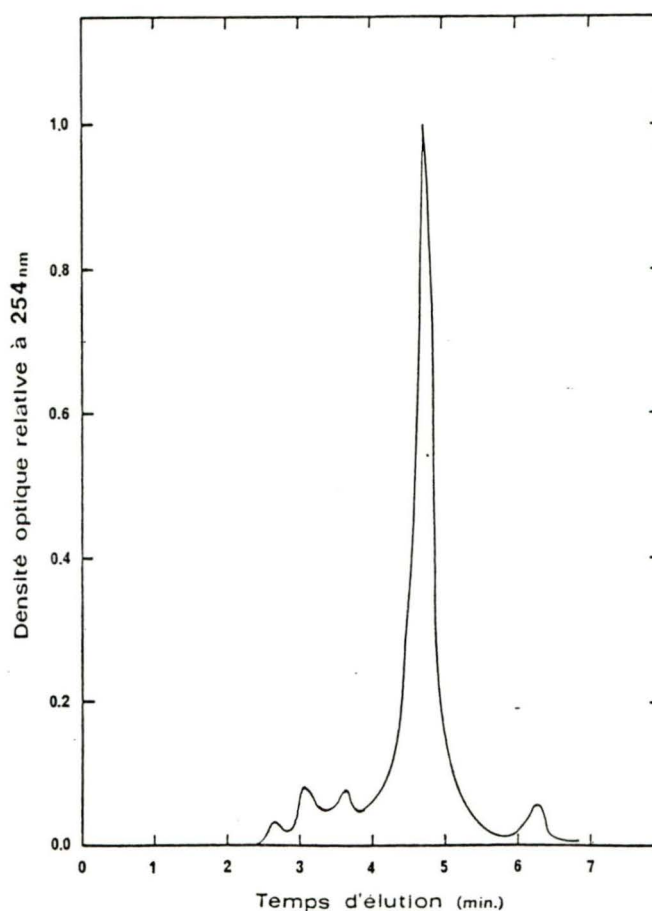


Fig. 7. Elution sur HPLC de notre préparation de McAb purifiée. Afin d'évaluer l'importance de la légère contamination observée sur l'électrophèse SDS-PAGE, la préparation de McAb a été éluée sur une colonne Superose 12 à un débit de 0.4 ml/min. Sur le chromatogramme, on constate que le McAb est de loin le principal constituant.

al. (1970) ont étudié ce phénomène qu'ils associent simplement à la déamination d'acides aminés comme la glutamine provoquant un changement de polarité chez ces chaînes qui migreront donc différemment de la chaîne légère intacte. En plus, des patrons de migration identiques ont été observés (Talbot et al, 1985) avec d'autres anticorps reconnus comme étant monoclonal.

ANODE

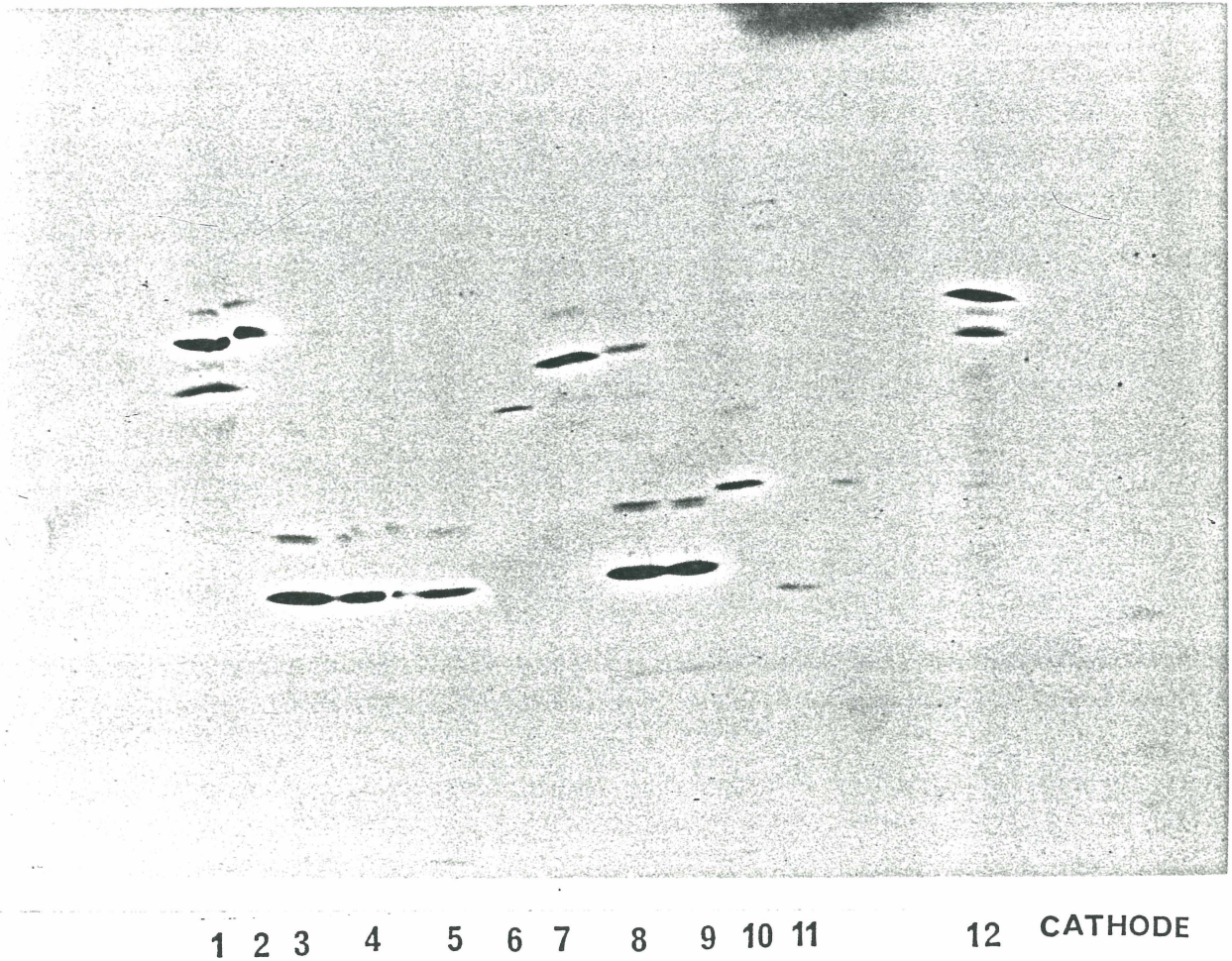


Fig. 8. Monoclonalité du McAb. L'autoradiogramme du gel de point isoélectrique nous démontre que notre anticorps est monoclonal puisqu'il possède qu'une seule chaîne légère à 4.7 cm de l'anode. La bande mineure à 4.1 cm est le résultats d'artefact impliquant la déamination d'acide aminé comme la glutamine. Notre McAb a été appliqué dans le puit # 7, les autres illustrent le profil de clones appartenant à d'autres chercheurs du CHUS.

2.3 CLASSE DE L'IMMUNOGLOBULINE

Le kit d'identification nous révèle significativement la présence d'un anticorps de type IgG_{2a}. Bien que les contrôles démontrent un niveau de bruit de fond très faible, on constate malgré tout dans les autres puits d'identification un certain niveau de coloration. Ce fait pourrait être imputable à des réactions croisées non spécifiques des divers anti-souris sur notre McAb. Néanmoins l'importante différence de densité optique entre ces derniers et le puit anti-souris IgG_{2a}, nous permet d'affirmer qu'on a un anticorps IgG_{2a}.

TABEAU 3

CLASSE ET SOUS-CLASSE DU McAb DETECTE PAR TEST ELISA	
Puit d'identification	Densité optique à 490 nm
Anti-souris IgG ₁	0.29
Anti-souris IgG _{2a}	0.81
Anti-souris IgG _{2b}	0.35
Anti-souris IgG ₃	0.34
Anti-souris IgM	0.21
Anti-souris IgA	0.32
Contrôle: McAb + peroxidase	0.08
Contrôle: peroxidase seul	0.06

2.4 LIAISON SELECTIVE IN VITRO SUR LES CELLULES MAC

Après avoir obtenu un anticorps monoclonal pur IgG_{2a}, sa spécificité in vitro pour les cellules tumorales MAC fut démontrée. A cette fin, on a mené une étude de spécificité qui nous a permis de juger sa qualité in vitro. La figure 9 illustre bien ce niveau de spécificité du McAb pour les cellules MAC.

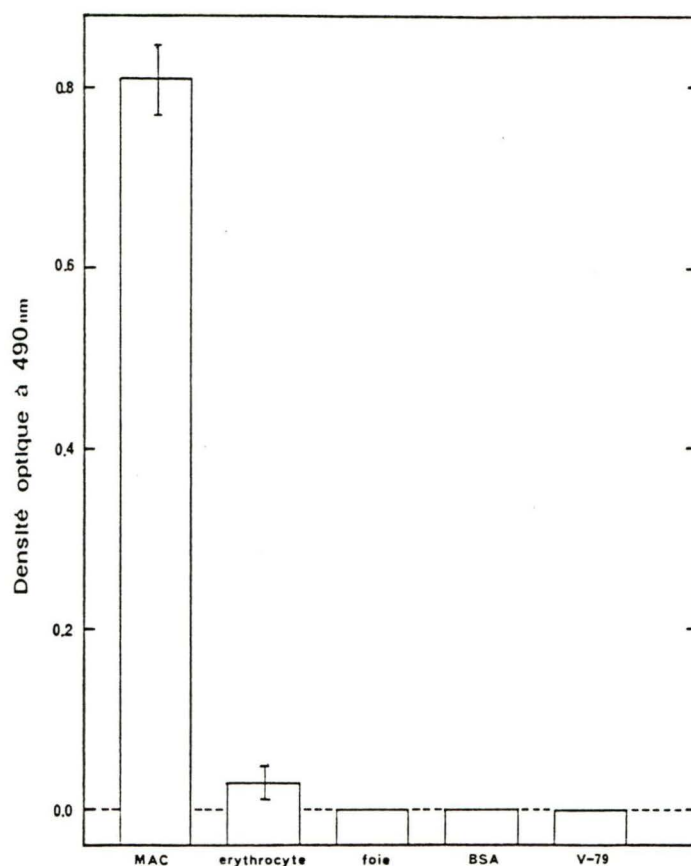


Fig. 9. Histogramme représentant le niveau de spécificité in vitro du McAb envers les cellules tumorales MAC. La réponse de densité optique est normalisée en fonction des deux enzymes (peroxidase et β - galactosidase) utilisés lors du test ELISA. On indique aussi l'écart-type obtenu.

2.5 NOMBRE D'ANTIGENES PAR CELLULE TUMORAL ET CONSTANTE D'ASSOCIATION

Le potentiel phototoxique du complexe McAb - phthalocyanine

dépendra du nombre de site d'attachement de l'anticorps sur la cellule tumorale et de sa constante d'association. Pour ce faire, une courbe de type Scatchard a été tracée comme décrit dans "matériel et méthodes" où l'intercepte avec l'abscisse nous indique sur la quantité de McAb radioactif liée sur environ 1×10^6 cellules.

Auparavant, on se devait de vérifier si l'anticorps une fois marqué possédait encore son affinité pour les cellules MAC. Cette information nous est donnée par le test d'immunoréactivité où la fraction d'anticorps monoclonal marqué immunologiquement réactive est déterminée par une extrapolation de sa liaison avec un excès d'antigène à l'infini. Ce graphe est représenté à la figure 10 où l'intercepte à l'ordonnée nous donne une valeur d'immunoréactivité variant de 83 à 92% selon le marquage effectué.

Connaissant cette valeur d'immunoréactivité, l'efficacité de purification et le nombre exact de cellules MAC, on calcule le nombre d'antigènes présent par cellule tumorale. La moyenne de nos deux expériences exécutées en triplicata est de 4.5×10^5 antigènes par cellule tumorale (figure 11). Ensuite, la constante d'association s'obtient en mesurant simplement la pente négative de ces deux précédents graphiques. En moyenne on a obtenu $1.6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$.

La validité de ces déterminations est vérifiée par un test contrôle de liaison non spécifique. Pour chaque point du test

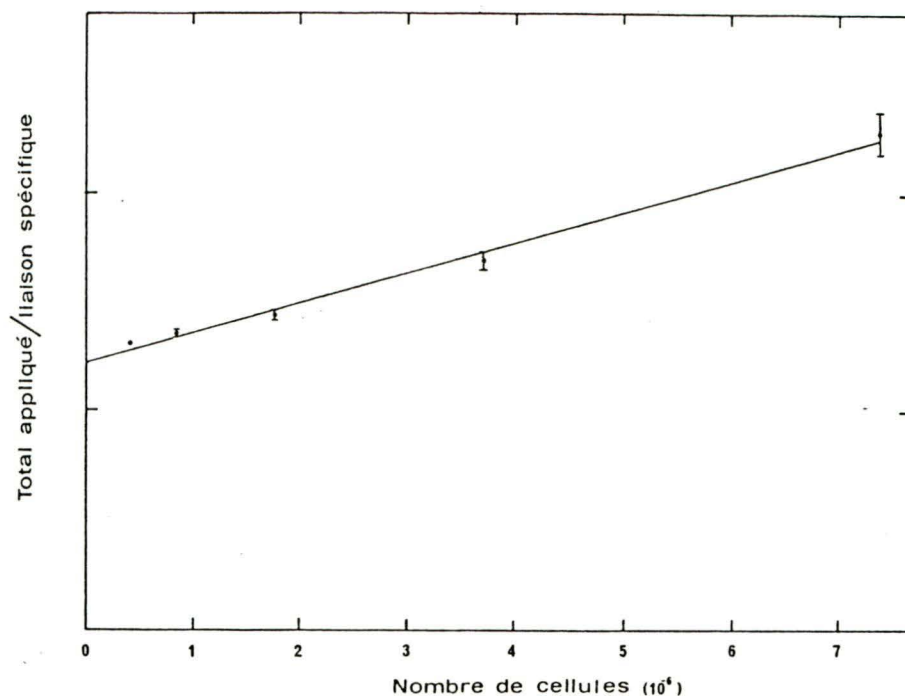


Fig. 10. Test d'immunoréactivité illustrant la liaison de l'anticorps marqué sur ses cellules tumorales cibles (MAC). La concentration de cellules passe de 2 à 0.125×10^6 suite à des dilutions doublants, tandis que la quantité de McAb- I^{125} est fixée à environ 30 000 cpm (10 ng) par tube d'essai. Par extrapolation, on détermine sur l'ordonnée la valeur inverse de la fraction de McAb marqué immunologiquement active. Pour chaque point, on a représenté la moyenne de trois déterminations et l'écart-type obtenu.

d'immunoréactivité, on a déterminé la quantité de McAb- I^{125} présent dans le tube d'essai suite à la saturation des sites spécifiques de liaison avec du McAb froid. La moyenne de ces neuf points donne une valeur très négligeable de $3.0\% \pm 0.6$ qui pourrait être autant associer au résidu de surnageant au-dessus du culot de cellules qu'à de la réelle liaison non spécifique sur la paroi du tube d'essai.

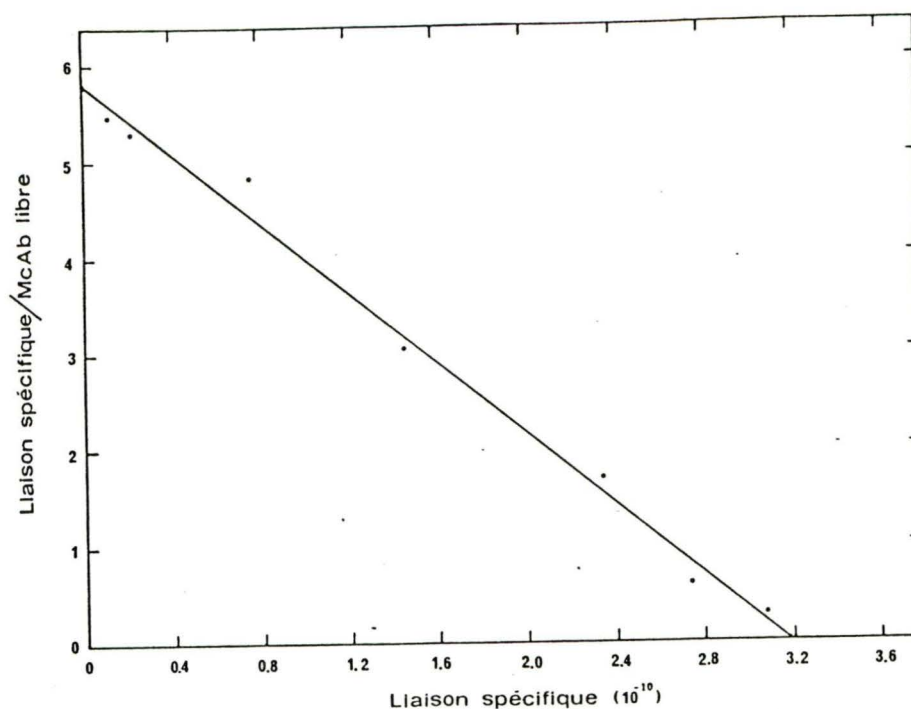


Fig. 11. Graphique de Scatchard. A une concentration fixe de cellules (1×10^6), est ajoutée une quantité de McAb marqué variant de 0.12 à 60 ng. Après incubation pendant 4 h à 4°C , la quantité d'anticorps liée et libre est déterminée. L'intercepte nous renseigne sur la quantité de McAb liée sur 1×10^6 cellules, tandis que la pente négative nous donne la constante d'association.

2.6 SPECIFICITE IN VIVO

Le potentiel du McAb comme transporteur in vivo a été évalué grâce à une étude de distribution chez le rat Fischer. Dans cette expérience, quatre groupes de trois rats furent injectés avec chacun $2\mu\text{g}$ McAb- I^{125} ($6\mu\text{Ci}$) ainsi que 0, 3, 6 ou $9\mu\text{g}$ de McAb froid par gr de poids de rat. L'indice de localisation tissu/sang cumulatif est illustré sur le tableau 4.

TABLEAU 4

RAPPORT TISSU/SANG EN FONCTION DE LA DOSE DE McAb FROID INJECTÉE				
Tissu	Rapport tissu/sang (+ écart-type) ^a			
	Dose McAb froid (µg/gr de rat)			
	0	3	6	9
tumeur	1.29 (0.45)	1.53 (0.42)	2.28 (0.61)	2.09 (0.35)
coeur	0.53 (0.01)	0.43 (0.05)	0.33 (0.01)	0.28 (0.04)
estomac	1.29 (0.10)	1.86 (0.77)	1.88 (1.02)	0.97 (0.56)
foie	18.53 (0.93)	34.00 (5.12)	20.58 (3.23)	7.97 (1.46)
intestin	0.85 (0.04)	0.74 (0.07)	0.72 (0.14)	0.69 (0.21)
muscle	0.13 (0.01)	0.14 (0.02)	0.21 (0.01)	0.15 (0.02)
poumon	71.52 (6.61)	12.01 (1.83)	4.97 (0.76)	2.17 (0.42)
rate	2.40 (0.09)	0.72 (0.12)	0.47 (0.03)	0.31 (0.02)
rein	4.57 (0.38)	1.70 (0.22)	0.91 (0.21)	0.54 (0.07)

^a Chaque rapport tissu/sang représente la moyenne obtenue avec 3 rats Fischer 344/CRBL femelle injectées avec 6 µCi de McAb marqué et une quantité de McAb froid variant de 0 à 9 µg/gr de rat.

Sur ce tableau, on remarque que le rapport tumeur/sang augmente en fonction de la dose de McAb froid. Inversement, l'indice initialement très élevé au niveau des poumons passe de 71.5 à 2.17. Moins spectaculaire, une baisse est aussi enregistrée à la rate, tandis qu'au niveau du foie on observe un maximum à une dose de 3 µg de McAb froid/gr rat.

Sur la figure 12, les variations de % dose/gr sont représentées pour le poumon, foie, rate et tumeur. Encore une fois, on remarque qu'en augmentant la dose de McAb froid on améliore l'accumulation au niveau de la tumeur qui passe de 0.14 à 1.12%. Simultanément, avec les autres organes, une baisse du niveau est observée. Notez encore une fois, l'allure un peu spéciale de la courbe de la rate où on assiste au

début à une certaine accumulation suivie d'une baisse de l'indice. Ces tendances semblent nous indiquer que notre McAb est spécifique aux

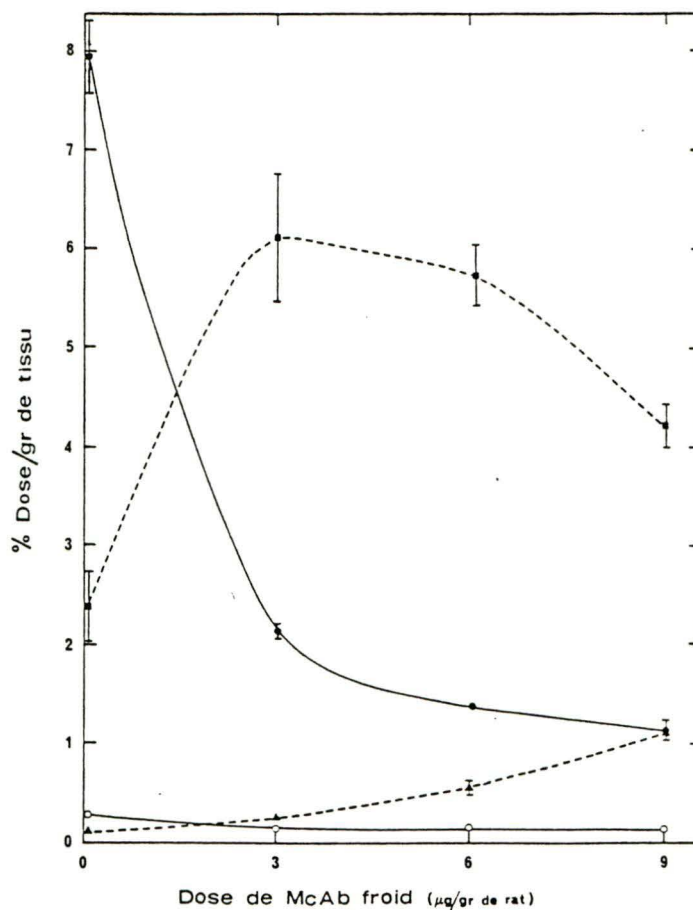


Fig. 12. Accumulation du McAb-I¹²⁵ en fonction de la quantité de McAb froid injectée. La concentration de McAb-I¹²⁵ est fixée à 2 µg (6 Ci), tandis que la dose de McAb froid varie de 0 à 9 µg/gr de rat. A la dose maximale, l'accumulation de l'anticorps sur la tumeur est constatée ainsi qu'une diminution sur le poumon, foie et rate. Les symboles représentent tumeur (▲), poumon (●), foie (■) et rate (○). L'écart-type est aussi illustré pour chaque point expérimental.

tumeurs MAC puisqu'il s'y accumule. Une vue globale de la spécificité tumorale est illustrée à la figure 13 qui représente le % dose/gr pour

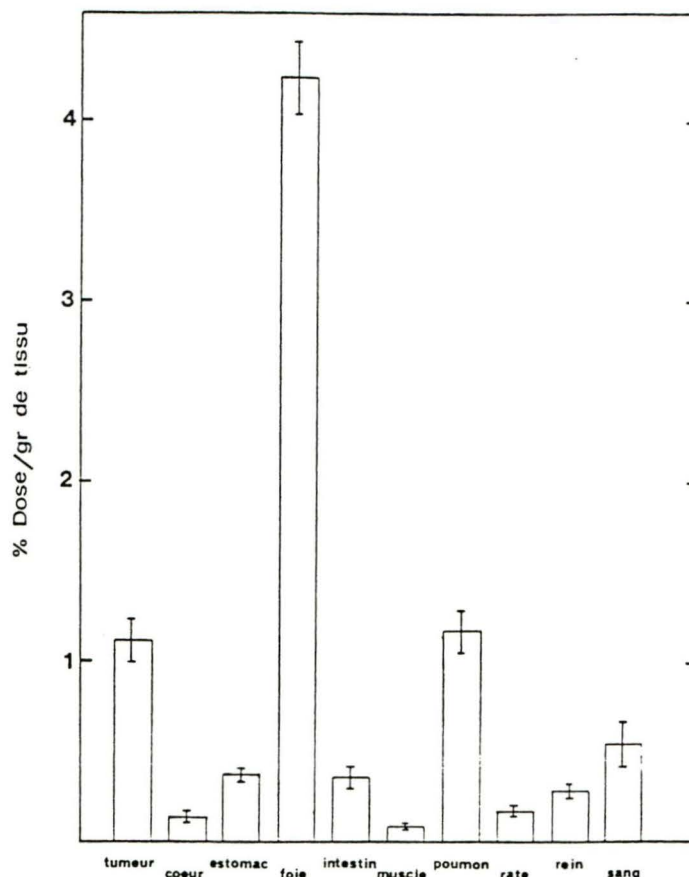


Fig. 13. Histogramme illustrant la spécificité du McAb-Il25. Cette représentation du pourcentage de dose injectée retenue par gr de tissu a été obtenu suite à l'administration de 6 Ci de McAb marqué (2) et 9 g/gr de rat du McAb froid après 24 h d'incubation. Pour chaque organe on indique l'écart-type obtenu avec les trois rats utilisés.

tous les tissus à la dose maximale de McAb froid. On note que le niveau d'accumulation pour le foie et les poumons est encore élevé comparativement à la tumeur malgré les précédentes améliorations. Néanmoins, en coinjectant du McAb froid (9 μ g/gr de rat) un niveau d'accumulation acceptable est obtenu.

DISCUSSION

Avant d'évaluer le potentiel thérapeutique d'un complexe McAb - phthalocyanine, on se doit de connaître et de bien comprendre les paramètres qui influencent l'efficacité photocytotoxique du phthalocyanine employé seul. Ainsi nous saurons sur quoi mettre l'emphasis pour rendre le complexe effectif et analyser les éventuels résultats d'une façon significative. Dans notre laboratoire plusieurs études ont été effectuées (Brasseur et al., 1987b ; Wagner et al., 1987) d'où il en ressort que l'efficacité de ces photosensibilisateurs tourne autour des points suivants: solubilité dans l'eau, localisation tumorale, tendance à l'agrégation et capacité de générer l'oxygène singulet. Ces facteurs peuvent se compléter ou se neutraliser selon, principalement, l'hydrophobicité du phthalocyanine. Dans le cadre des présentes études, on a évalué de quel façon le degré de sulfonation relie l'efficacité phototoxique des SPC avec leur absorption membranaire et leur pénétration cellulaire.

Tout d'abord, on a examiné l'influence du degré de sulfonation des AlCl-SPC (rapport S/PC) sur leur efficacité phototoxique. Deux séries d'expériences ont été effectuées: 1- la concentration de SPC variait (LD_{90}) et 2- Le temps d'incubation avec les cellules variait à une concentration fixe de drogue (LT_{90}). Il en ressort que la préparation de AlCl-SPC la plus hydrophobe ($S/PC = 2.0$) est aussi la plus photocytotoxique ($LD_{90} = 1.7\mu M$, $LT_{90} = 0.6h$) ce qu'on relie à son enrichissement en isomères disulfonés les plus hydrophobes (90%). Selon leur mode de purification, ces derniers isomères seraient ceux avec les

deux groupements sulfonés attachés sur des noyaux benzène adjacents (fig. 5). La fraction avec un rapport S/PC de 2.7 est moins photocytotoxique ($LD_{90} = 4.5\mu M$, $LT_{90} = 10.4$ h) et malgré qu'elle contient 30% de disulfonés ces isomères sont principalement ceux les moins hydrophobes. Finalement la fraction 3.6 qui contient des tri et tetrasulfonés est considérablement moins active ($LD_{90} = 38.3\mu M$). Notez que les mono et non sulfoné PC n'ont pas été testé à cause de leur pauvre solubilité dans l'eau ce qui les empêche d'être équitablement comparé avec les autres SPC et limite aussi leur application en PDT.

Le microscope à fluorescence nous a ensuite permis d'établir une corrélation liant la distribution cellulaire et le rapport S/PC. On constate donc que les isomères les plus hydrophobes ($S/PC = 2.0$) pénètrent les mieux la membrane cellulaire et qu'ils diffusent uniformément dans le cytoplasme tandis que dans le noyau aucune fluorescence significative est observée. D'autre part, la fraction la plus hydrophile ($S/PC = 3.6$) ne pénètre presque pas la membrane cellulaire et ne démontre pas de photocytotoxicité significative.

Une analyse de nos résultats nous amène à constater qu'il y a une relation évidente entre la présence des isomères disulfonés les plus hydrophobes, la capacité phototoxique et la pénétration cellulaire. En analogie avec une étude effectuée dans notre laboratoire avec des phenyl porphyrins sulfonés utilisés comme standard sur notre HPLC (gracieuseté de M. Winkelman), on constate que les disulfonés les plus hydrophobes sont ceux ayant les groupements sulfonés sur des anneaux benzène adjacents (fig. 14). Cette observation a aussi été faite par Kessel et al (1987) avec ces mêmes porphyrines sulfonées. En parallèle, une

corrélation similaire à celle qu'on vient de faire avec les AlCl-SPC a aussi été effectuée dans notre laboratoire avec divers isomères de disulfoné GaCl-SPC. En analysant ces résultats, on en déduit que lorsque les groupements sulfonés sont attachés à des anneaux benzène opposés, le GaCl-SPC est inactif. Inversement la meilleure photocytotoxicité est obtenue avec les isomères les plus hydrophobes où les groupements sulfonés sont positionnés sur les anneaux benzène adjacents (Brasseur et al., 1987b). Ces travaux nous suggèrent un mécanisme de diffusion trans-membranaire qui expliquerait pourquoi les isomères disulfonés les plus hydrophobes sont aussi les plus photoactifs. Premièrement, on sait qu'une membrane bilipidique sans protéine est imperméable aux molécules chargées et que par conséquent ceux-ci ont besoin d'un transporteur pour traverser la membrane (Alberts et al., 1983). Deuxièmement des études effectuées sur une bicouche lipidique artificielle (Chatelier et al., 1985) avec une protoporphyrine qui possède deux groupements chargés adjacents et un grand cycle aromatique nous révèlent que ce dernier interagit avec la membrane comme un composé amphibique. C'est à dire que sa portion hydrophobe pénètre la bicouche lipidique, tandis que les groupements chargés demeurent à la surface de la membrane.

On a alors pensé que nos phthalocyanines se fixaient sur la membrane cellulaire en exploitant cet aspect amphibique. Les disulfonés SPC adjacents se serviraient donc de leur portion hydrophobe pour s'enfoncer favorablement dans la bicouche lipidique membranaire. Ensuite leurs groupements sulfonés interagiraient avec une protéine trans-membranaire permettant ainsi leur transport dans le cytoplasme (figure

14). Ce mécanisme de diffusion expliquerait pourquoi les disulfonés opposés, tri et tetrasulfonés SPC qui ne possèdent pas cette propriété amphibique pénètrent peu la membrane cellulaire et ont une photocytotoxicité insignifiante. Pour ce qui est du noyau aucune fluorescence significative ne fut observée. Or on sait que des dommages

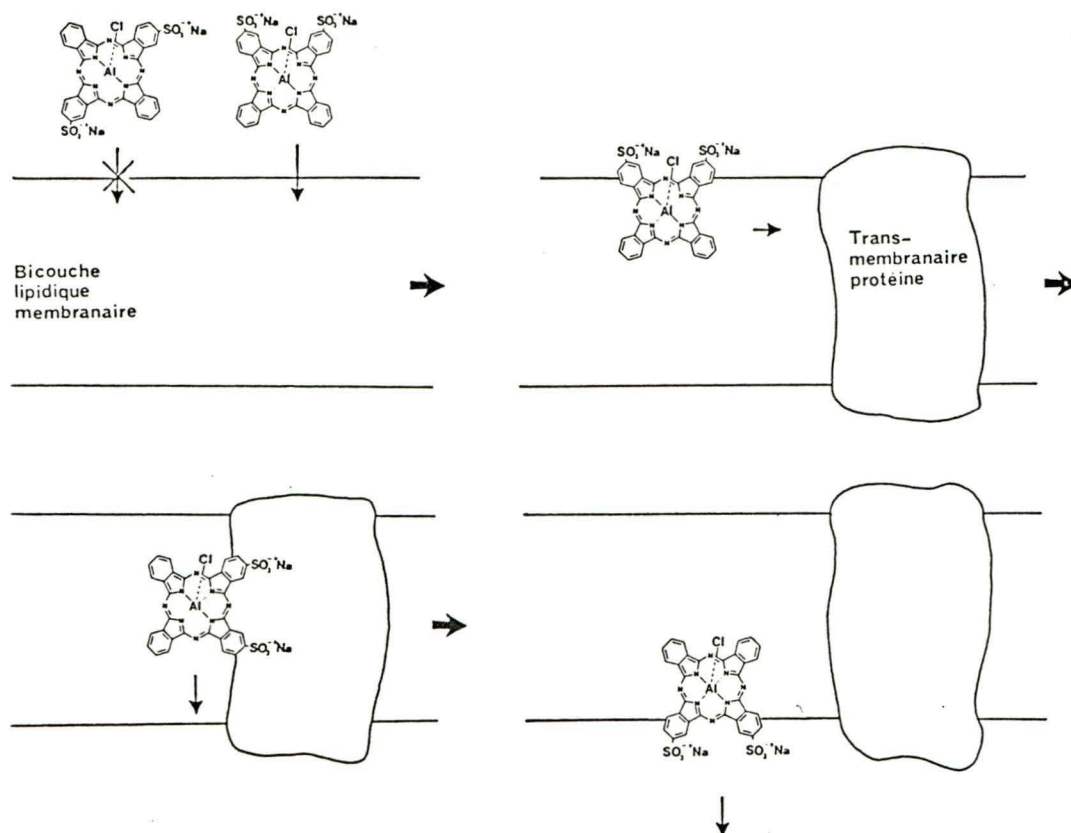


Fig. 14. Mécanisme de diffusion membranaire proposé pour les disulfonés AlCl-SPC. Les isomères ayant leur groupements sulfonés situés sur des noyaux benzène adjacents forment une molécule amphibique dont la section hydrophobe s'enfonce favorablement dans la membrane lipidique. Le transfert dans le cytoplasme est ensuite rendu possible grâce à des interactions avec une protéine trans-membranaire.

à l'ADN on déjà été observés (Ben-hur et al., 1987; Hunting et al., 1987) mais à des niveaux insuffisants pour expliquer la phototoxicité cellulaire. En fait, en partant des résultats de Ben-hur et al. (1986)

qui ont observé qu'en incubant pendant 16 h 25 μ M de AlCl-SPC il n'y a que 0.4 nM de drogue par 10^6 cellules fibroblastique V-79 B 310-H, on conclut que le gradient de diffusion entre le milieu de culture et le cytoplasme est de beaucoup supérieur à celui entre ce dernier et le noyau. Ce gradient serait donc insuffisant pour que l'on puisse observer une distribution des SPC dans le noyau. Cette hypothèse suggère aussi que des molécules réactives photogénérées dans le cytoplasme diffuseraient dans le noyau pour ainsi endommager l'ADN.

In vivo, si le même mécanisme de transport trans-membranaire existe, le manque d'activité des phthalocyanines pourrait s'expliquer par un manque d'accumulation de la drogue dans les cellules tumorales. En effet, in vivo il est évident qu'on ne retrouve pas la même force de gradient que celle provoquée in vitro. Par conséquent, la vitesse de diffusion trans-membranaire et le niveau d'accumulation des phthalocyanines devraient être inférieurs in vivo. Cette étape limitante pourrait être surmontée en fixant une chaîne aliphatique de 5 à 12 carbones sur chacun des deux noyaux benzène adjacents non sulfonés du disulfonés adjacents phthalocyanine. Nous devrions alors avoir un meilleur coefficient de partition lipide-milieu aqueux ce qui devrait permettre de faciliter la diffusion trans-membranaire et amener un haut niveau d'accumulation tumoral avec une force de gradient beaucoup moindre.

L'impact de ces études sur le comportement idéal d'un complexe McAb-SPC serait que celui-ci se doit de pénétrer dans le cytoplasme pour espérer être photoactif. On ne connaît pas la cible principale dans le

cytoplasme , s'il y en a une, mais une réparation uniforme du complexe semble y être souhaitable pour permettre à l'oxygène singulet généré par les SPC d'être effectif. On ne peut donc pas se contenter d'un anticorps monoclonal qui ne ferait que se fixer sur la membrane cellulaire. En contrepartie, des études de distribution in vivo nous informe que 5 fois plus de Hpd s'accumulerait dans le stroma de la tumeur comparativement aux cellules tumorales (Dougherty, 1985a). Le manque de photoactivité in vivo des sulfophthalocyanines comparativement au DHE pourrait donc être causé par un patron de distribution tumorale différent et non à une perte de son haut potentiel photochimique dans un milieu cellulaire (exemple: coefficient d'absorption molaire élevé et état triplet de long demi-vie). En effet, on constate inévitablement la supériorité in vitro des phthalocyanines où ils attaquent directement la cellule tumorale. Un protocole thérapeutique idéal pourrait donc comporter une coinjection de sulfophthalocyanine (ou DHE) libre et complexé à un McAb afin d'atteindre à la fois le stroma et les cellules tumorales.

Dans un deuxième temps, nos études ont porté sur l'évaluation des propriétés du McAb en mettant en relief les paramètres importants à respecter pour avoir un bon transporteur. Le potentiel du McAb fut d'abord évalué d'un point de vue in vitro où trois principaux paramètres nous semblent importants (Larson, 1985; Poste et Kirsh, 1983): 1- nombre d'antigènes par cellule tumorale ($> 10^5$), 2- constante d'association ($> 10^{10} \text{ M}^{-1}$) et 3- internalisation du McAb. Ce dernier point sera éventuellement vérifié par microscopie à fluorescence lorsqu'on aura fixé le phthalocyanine sur l'anticorps. Pour ce qui est des deux premiers, on a obtenu des résultats très intéressants. C'est à

dire un nombre d'antigènes par cellule tumorale de 4.5×10^5 et une constante d'association de $1.6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$.

Notre McAb s'est aussi avéré spécifique au MAC puisqu'aucune liaison significative ne fut détectée sur nos contrôles (érythrocytes, foie, V-79, BSA). A des fins de publications, nous compléteront éventuellement avec des contrôles sur le muscle, poumon et rate afin d'appuyer les résultats obtenus in vivo. Néanmoins, on sait que le McAb n'a pas besoin d'être spécifique à 100% à cause de la dirigeabilité de la lumière rouge utilisée. Ces résultats nous permettent donc d'affirmer que notre McAb a un bon potentiel in vitro et devrait être utilisé comme outil de travail pour étudier in vitro la photocytotoxique d'un éventuel complexe McAb - phthalocyanine.

Etant donné que l'efficacité phototoxique de ce complexe sera aussi mesurée in vivo, on a vérifié l'accessibilité de ses antigènes sur la tumeur implantée chez le rat. Une bonne accessibilité se reflète par un bon rapport de distribution tumeur/sang et par un haut pourcentage de dose injectée retenue par gr de tumeur (% dose/gr).

Après avoir injecté seulement le McAb-I¹²⁵ (2 µg, 6 µCi), on a obtenu un rapport tissu/sang pour les poumons, rate et foie de 71.5, 18.5 et 2.40 alors que le % dose/gr est respectivement 7.95, 2.06 et 0.27 %. En contrepartie la tumeur exprimait un rapport tumeur/sang et un % dose/gr de seulement de 1.29 et 0.14. soit l'équivalent d'un organe non cible! Ces résultats surprenants semblaient nous amener à la triste conclusion que notre McAb ne pouvait pas être un bon transporteur

in vivo, ces antigènes étant inaccessibles.

Cependant, on se souviendra qu'avec le test ELISA, on a enregistré une très grande affinité pour les cellules MAC et presque rien pour celles du foie. Soit l'inverse des résultats in vivo où l'anticorps s'accumule 17 fois plus au niveau du foie. Afin de comprendre ces résultats, il faut se rappeler que la section Fc des anticorps peut se lier non spécifiquement avec les récepteurs Fc des macrophages et des leucocytes polymorphonucléaires. Ces macrophages sont d'ailleurs principalement distribués dans les poumons, foie et rate qui justement sont ici la cause de nos problèmes. Les IgG n'ont pas tous la même affinité pour les macrophages, certains s'y lient fortement et d'autre presque pas (Bach et Lesavre, 1981). Ce facteur influence donc énormément le temps de demi-vie métabolique des IgG qui varie de 3 à 12 jours (Ballou et al., 1985).

L'anticorps monoclonal avec lequel on travaille est de classe IgG_{2a} dont le récepteur sur les macrophages est connu depuis longtemps (Rosenstreich, 1981) et porte le nom de FcRI. C'est là probablement la cause de l'accumulation non spécifique qu'on enregistre au niveau du poumon, foie et rate. Dans la littérature certains auteurs (Beaumie et al., 1985) augmentent l'accumulation au niveau de la tumeur en administrant des doses élevées d'anticorps froid (80 à 320 µg/gr de souris ou 750 à 2000 µg pour un rat de 125 gr). Cependant d'autres (Hagan et al., 1986; Pimm et al., 1987) n'injectent que de 1 à 2 µg de McAb marqué IgG_{2a} et obtiennent des rapports tumeur/sang de 2.5 à 4 et des % dose/gr de 13 à 30%. Cependant, ces dernières études ont été effectuées sur des souris Nude qui ne possédant pas de thymus ont un

niveau de lymphocytes T matures presque nul. Ce manque de lymphocytes T matures entraîne une déficience en lymphokines dont les macrophages ont besoin pour activer leurs récepteurs Fc (Vogel et Rosenstreich, 1979). On ne peut donc pas comparer nos études avec ces dernières faites sur une souris Nude, mais l'addition de McAb froid paraît justifier et permet d'augmenter l'accumulation du McAb-I¹²⁵ au niveau de la tumeur.

Le comportement in vivo de divers IgG est très différent et il convient donc d'utiliser les paramètres appropriés pour augmenter la localisation de son propre McAb. Dans notre cas, la dose de McAb-I¹²⁵ ne représente que 2 µg par rat ce qui est de beaucoup inférieure à la dose de 2000 µg par rat donnée précédemment (Beaumie et al., 1985). Avec les liaisons non spécifiques au niveau des poumons, foie et rate, on conçoit aisément que l'anticorps marqué ne soit pas accessible pour la tumeur. En co-injectant 9 µg de McAb froid par gr de rat (1125 µg au total), on a amélioré le % dose/gr de 8 fois passant de 0.14 à 1.12%. En parallèle, cet indice a diminué de 6.8 et 1.6 fois au poumon et à la rate respectivement. Tandis qu'au niveau du foie, on enregistre une première hausse (3 µg McAb froid/gr) suivie d'une baisse à 9 µg/gr rat. Ce fait est probablement causé par le déplacement des McAb-I¹²⁵ des poumons, principalement, vers le foie où les sites non spécifiques étaient probablement moins saturés.

Ce paramètre est donc très important dans notre cas et malgré qu'on ait maintenant un % dose/gr respectable on l'améliorera en injectant encore davantage de McAb froid. Cependant, cette approche entraînerait un problème d'approvisionnement en McAb. On essaiera donc soit

d'administrer des IgG_{2a} commerciales pour remplir la tâche de saturer les sites de liaison non spécifiques, ou on pourrait inhiber la liaison sur les récepteurs Fc en liant du dextran sur la portion Fc du McAb.

Finalement, soulignons qu'en utilisant notre McAb en PDT celui-ci n'a pas besoin d'être spécifique à 100% puisque le rayonnement de lumière est dirigeable ce qui permet de protéger les organes non cibles. Cependant, il faudra évidemment ne jamais observer de complexe McAb-SPC au niveau de la peau pour éviter l'effet alors toxique des rayons du soleil. C'est donc plutôt le niveau d'accumulation tumorale qui devient un facteur marquant. Dans ce contexte, on a limité notre analyse à savoir si on peut se servir de notre McAb comme outil de travail in vivo. A une telle question, on peut seulement répondre oui, mais à condition de coinjecter des McAb non liés au phthalocyanine, des IgG_{2a} commerciales ou de protéger la portion Fc du McAb avec du dextran.

CONCLUSION

Nos travaux ont servi à cerner et évaluer les paramètres qui influencent le potentiel d'un complexe anticorps monoclonal - phthalocyanine en thérapie photodynamique. Dans un premier temps, on a étudié le mode d'action du photosensibilisateur en établissant le lien entre le nombre de groupements sulfonés sur une molécule de phthalocyanine, l'efficacité photocytotoxique et la distribution intracellulaire de divers AlCl-SPC. Ceci nous a permis de vérifier la relation voulant que l'efficacité photocytotoxique soit inversement proportionnel à la polarité (rapport S/PC) des AlCl-SPC. On a alors proposé que les isomères disulfonés adjacents pénètrent plus efficacement la membrane cellulaire à cause de leur caractère amphibique. Une fois celle-ci traversée, ils se diffuseraient uniformément dans le cytoplasme.

En parallèle, notre anticorps monoclonal s'est révélé un bon transporteur in vitro alors qu'in vivo l'accessibilité des antigènes est évidente et l'accumulation sur la tumeur est dépendante de la dose de McAb froid administrée.

On a donc un système d'étude transporteur - cellule cible adéquat pour évaluer le potentiel phototoxique in vitro et in vivo du complexe McAb - phthalocyanine. Dans nos futurs travaux, on maximisera le nombre de SPC par molécule de McAb afin d'obtenir un haut potentiel phototoxique tout en s'assurant de conserver l'affinité tumorale. Deuxièmement, l'internalisation dans la cellule MAC du complexe formé

devra être vérifié. Troisièmement, on tentera d'augmenter l'accumulation du McAb sur la tumeur soit: a) en saturant les récepteurs Fc sur les macrophages avec des IgG_{2a} commerciaux de rat ou 2) en inhibant l'interaction avec ce recpteur en protégeant la portion Fc du McAb avec du dextran d'augmenter l'accumulation sur la tumeur. Finalement, on établira la relation entre l'efficacité de photooxydation et la longueur du lien unissant le McAb au SPC. En effet selon la distance les séparant, l'oxygène singulet pourrait être moins efficacement généré et avoir un parcours de diffusion différent. Il serait aussi davantage quencher par l'anticorps si le photosensibilisateur est placé trop près ce qui diminuerait les probabilités de photooxyder les biomolécules dans la cellule.

REMERCIEMENT

Dans un premier temps, je remercie sincèrement celui qui fut la pierre angulaire de mon cheminement au M.Sc., mon directeur de recherche le Dr Johan E. van Lier. De part son sens de l'organisation, son amour pour la recherche et sa grande sagesse il fut, il est et sera toujours un grand modèle à suivre. Dr van Lier, merci.

Je remercie aussi le directeur du département de médecine nucléaire et de radiobiologie Théodore Tahan M.D. ainsi que l'ancien directeur Etienne LeBel M.D. de bien avoir voulu m'accueillir.

Je souligne aussi la collaboration du Dr Brian Talbot qui fut de par ses conseils, un outil indispensable à ma formation en immunologie. Je le remercie aussi pour son apport technique lors de la réalisation du test de monoclonalité.

De compagnie fort agréable et très appréciée, le Dr Darel Hunting fut aussi un conseiller de premier choix. Sa grande disponibilité ainsi que son esprit logique et méthodique furent à maintes reprises hautement estimés.

Je tiens aussi à remercier Mr Réjean Langlois ainsi que Dr Ali Hasrat pour leur travail de haute qualité lors de la purification et la synthèse des aluminium chloro phthalocyanines.

J'aimerais aussi exprimer toute ma gratitude envers Dr René Ouellet

qui fut non seulement un excellent conseiller, mais surtout un compagnon de travail très apprécié.

Les conseils de Dr Jacques Rousseau, particulièrement en statistique et en biologie, furent très appréciés. Merci beaucoup.

A Madame Nicole Brasseur, je voudrais exprimer mes sincères remerciements, pour bien avoir voulu me montrer comment exécuter un test de photocytotoxicité.

Les études de distribution intracellulaire des AlCl-SPC auraient été impossible sans l'apport du microscope à fluorescence du Dr Carlos Brailovsky. Merci beaucoup.

Je remercie aussi Drs Jean-Guy Lehoux, Marek Pleszcynski et Jurgen Sygush qui dans un esprit de coopération scientifique ont bien voulu me permettre d'utiliser respectivement le lecteur de test ELISA Bio-Tek instruments EL-310, le support de centrifugation des plaques ELISA et la colonne pour HPLC Superose 12.

Finalement, je tiens à remercier le Dr Pierre Sirois d'avoir bien voulu jeter son regard critique et expérimenter sur mon humble mémoire de maîtrise. Merci.

BIBLIOGRAPHIE

- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et J. D. Watson (éditeurs); (1983). Dans Molecular biology of the cell, p. 286-289. Garland Publishing, New-York.
- Austen, J-D., S. Mc Connell, C. J. Carrano et M. Tsutsui. (1978). Intracellular localization, of méso-tetra (p-sulfophenyl) porphine: A potential tumor localizing agent cancer treatment reports. 62, p. 511-518.
- Awdeh, Z. L., A. R. Williamson et B. A. Askonas. (1970). One Cell-one Immunoglobulin Biochem. J. 116 p. 241-248
- Back, J-F. et P. Lesavre, (1981). Immunologie. Flammarion. France. p. 27 et 54.
- Balchum, O. et P. R. Doiron. (1985). Photoradiation therapy of endobronchial lung cancer. Clin. Chest-Med. 6, p. 225-275.
- Ballou, B., J. Reiland, G. Levine, B. Knowles et T. R. Hakala (1985). Tumor location using F(ab)₂ from a monoclonal IgM antibody: pharmacokinetics, J. Nucl. Med. 26. p. 283-292.
- Beaumier, P. L., K. A. Krohn, J. A. Carrasquillo, J. Eary, I. Hellstrom, K. E. Hellstrom, W. B. Nelp et S. M. Larson. (1985). Melanoma Localization in Nude mice With monoclonal Fab against. p. 97. J.

Nucl. Med. 26, p. 1172-1179.

Ben-Hur, E. et I. Rosenthal. (1985). Photosensitized inactivation of Chinese hamster cells by phthalocyanines. Photochem. Photobiol. 42, p. 192-193.

Ben-Hur, E. et I. Rosenthal. (1986). Photosensitization of Chinese hamster cells by water-soluble phthalocyanine. Photochem. Photobiol. 43, p. 615-619.

Ben-Hur, E., I. Rosenthal, S. G. Bown and D. Philips (1987). The phthalocyanine: Sensitizers with potential for photodynamic therapy of cancer. Dans E. Ben-Hur et I. Rosenthal (eds). Photomedicine, CRC Press, Boca Raton. FL.

Bigbee, W. L., M. Vanderlaan, S. S. N. Fong et R. H. Jensen. (1983). Monoclonal antibodies Specific for the M- and N- forms of human glycophorin A. Molecular Immunology. 20, p. 1353-1362.

Bown, S. G., C. J. Tralau, P. D. Coleridge Smith, D. Akdemir et T. J. Wieman. (1986). Photodynamic therapy with porphyrin and phthalocyanine sensitization: quantitative studies in normal rat liver. Br. J. Cancer 54, p. 43-52.

Brasseur, N., H. Ali, D. Autenrieth, R. Langlois et J. E. van Lier. (1985). Biological activities of phthalocyanine - III. Photoinactivation of V-79 Chinese hamster by tetrasulfophthalocyanines. Photochem. Photobiol. 42 p. 515-521.

- Brasseur, N., H. Ali, R. Langlois, J. R. Wagner, J. Rousseau et J. E. van Lier. (1987a). Biological activities of phthalocyanines - V. Photodynamic therapy of E M T - 6 mammary tumors in mice with sulfonated phtalocyanines. Photochem. Photobiol. 45, p. 581-586.
- Brasseur, N., H. Ali, R. Langlois et J. E. van Lier. (1987b). Biological activités of phthalocyanines - VII. Photoactivation of V-79 Chinese Hamster cell by selectively sulfonated gallium Phthalocyanine. Photochem. Photobiol. sous presse.
- Brodeur, B. R., P. Tsang et Y. Larose. (1984). Parameters affecting ascites tumor formation in mice and monoclonal antibody production. Journal of Immunological Methods. 71, p. 265-272.
- Chan, W-S., R. Svensen, D. Phillips and I. R. Hart. (1986). Cell uptake, distribution and response to aluminum chlorosulphonated phthalocyanine, a potential antitumour photosensitizer. Br. J. Cancer. 53, p. 255-263.
- Chatelier, R. C., W. H. Sawyer, A-G. Swincer and A. D. Ward (1985). Dans D. Kessel (ed). Methods in phophyrin photosensitization. Plenum Press, New-York. 193, p. 169-180.
- Darwent et al.. (1982). Metal phthalocyanines and porphyrins as photosensitizers for reduction of water to hydrogen. Coordination Chemistry Reviews. 44, p. 83-126.

- Dougherty, T. J. (1985a). Photodynamic therapy. Dans D. Kessel (ed).
Methods in porphyrin photosensitization. p. 313-328. Plenum.
New-York.
- Dougherty, T. J. (1985b). Photodynamic therapy. Clin. Chest Med. 6,
p. 219-236.
- Foote, C. S. (1982). Light, oxygen and toxicity. Dans A. P. Autor
(ed). Pathology of oxygen p. 21-44. Academic Press, New-York.
- Foote, C. S. (1984). Mecanisms of photooxygenation dans D. R. Doiron et
C. J. Gomers (eds).. Porphyrin Localization and treatment of
tumors. Alan R. Liss, New-York, 170, p. 3-18.
- Garrete De Young, H. (1986). Monoclonal antibodies: promises
fulfilled. High Technology, p. 32-41.
- Goldie, J. H. et Av. Coldman. (1985). Genetic instabilit, in the
development of drug resistance. Semin. Oncol. 12, p. 222-230.
- Hagan, P. L., S. E. Halpern, R-O. Dillman, D. L. Shawler, D. E. Johnson,
A. Chen, L. Krishnan, J. Frincke, R. M. Bartholomew, G. S. David et
D. Carlo. (1986). Tumor size: Effect on monoclonal antibody
uptake in tumor models. J. Nucl. Med. 27, p. 422-427.
- Haisma, H. J., J. Hilgers et V. R. Zurawski Jr. (1986). Iodination of
monoclonal antibodies for diagnosis and radiotherapy using a

- convenient one vial method. J. Nucl. Med., 27, p. 1890-1895.
- Hayata, H. et al. (1985). Photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative in cancer of the upper gastrointestinal tract. Sem. Surg. Oncol., 1, p. 1-11.
- Hunting, D. J., B. J. Gowans, N. Brasseur et J. E. van Lier. (1987). DNA damage and repair following treatment of V-79 cells with sulfonated phthalocyanines. Photochem. Photobiol. 45, p. 769-774.
- Hurwitz, E., R. Levy, R. Maron, M. Wilchek, R. Arnon et M. Sela. The covalent binding of daunomycin and adriamycin to antibodies, with retention of both drug and antibody activities. Cancer Research. 35, p. 1175-1181.
- Keenan, A. M., J. N. Weinstein, J. L. Mulshine, J. A. Carrasquillo, P. A. Bunn, J. C. Reynolds et S. M. Larson. (1987). Immunolymphoscintigraphy in patients with lymphoma after subcutaneous injection of indium - III. Labeled T 101 Monoclonal antibody. J. Nucl. Med. 28, p. 42-46.
- Khaw, B. A., H. W. Strauss, S. L. Cahill, H. R. Soule, T. Edgington et J. Cooney. (1984). Sequential imaging of indium - III - labeled monoclonal antibody in human mammary tumors hosted in Nude mice. J. Nucl. Med. 25, p. 592-603.

Khoury, S. (1979). Cancer, Paris Hachette, p. 166-244.

Kolata, G. (1986). Why do cancer cells resist drugs? Science, 231, p.220-221.

Land, E. J. (1984). Current topics porphyrin phototherapy of human cancer, Int. J. Radiat. Biol., 46, p. 219-223.

Langlois, R., H. Ali, N. Brasseur, J. R. Wagner and J. E. van Lier. (1986). Biological activities of phthalocyanines. IV Type II sensitized photo-oxidation of L- tryphan and cholesterol by sulfonated metallophthalocyanines. Photochem. Photobiol., 44, p.117-125.

Larson, S. M. (1985). Radiolabeled monoclonal anti-tumor antibodies in diagnosis and therapy. J. Nucl. Med. 26, p. 538-545.

Levy, R. et R. A. Miller. (1983). Minisymposium summary: Tumor therapy with monoclonal antibodies. Federation Proceedings. 42, p. 2650-2656.

Lindmo, T., E. Boven, F. Cuttitta et P. A. Bunn Jr. (1984). Determination of the immune reactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to Binding at infinite antigen excess. J. Immun. Meth. 72, p. 77-89.

Linstead, R. P. et F. T. Weiss. (1950). Phthalocyanines and related compounds. Part XX. Further investigations on tetrabenzporphyrin

and allied substances. J. Chem. Soc., p. 2975-2981.

Mach, J. P., F. Buchegg, M. Forms et al. (1981). Use of radiolabeled monoclonal anticarcinoembryonic antigen antibodies for the detection of human carcinomas by external photoscanning and tomoscintigraphy. Immunol. Today, 2, p. 239-249.

Mew et al. (1983). Photoimmunotherapy: Treatment of animal tumors with tumor-specific monoclonal antibody-hematoporphyrin conjugates. Immunol., 130, p. 1473-1477.

Moan, J. (1986). Yearly review: Porphyrin photosensitization and phototherapy. Photochem Photobiol. 43, p. 681-690.

O'Shannesy, D. J., M. J. Dobersen et R. H. Quarles. (1984). A novel procedure for labelling immunoglobulins by conjugation to oligosaccharide moieties. Immunology Letters, p. 273-277.

Pimm, M. V., A. C. Perkins et R. W. Baldwin. (1987). Diverse characteristics of ¹¹¹In labelled anti-CEA monoclonal antibodies for tumour immunoscintigraphy: Radiolabelling, distribution and imaging studies in mice with human tumour xenografts. Eur. J. Nucl. Med. 12, p. 515-521.

Poste, G. et R. Kirsh. (1983). Site-specific (Targeted) drug delivery in cancer therapy. Biotechnology, p. 869-878.

- Ritz, J., J. M. Pesando, S. E. Sallan, L. A. Clavell, J. Notis-McConarty, P. Rosenthal et S. F. Schlossman. (1981). Serotherapy of acute lymphoblastic leukemia with monoclonal antibody. *Blood*, 58, p. 141-152.
- Rosen, S. T., E. A. Lambiase, Y. Ma, J. A. Rodosevich et A. L. Epstein. (1985). Monoclonal antibodies. Their promise for tumor diagnosis, staging and therapy. *Postgraduate Medecine* 77, p. 129-134.
- Rosenstreich, D. L. (1981). The macrophage. Dans J. J. Oppenheim (ed). *Cellular functions in immunity and inflammation*. New-York, p. 127-159.
- Selman, S. H., M. Kreimer-Birnbaum, K. Chaudhuri, G. M. Garbo, D. A. Seaman, R. W. Keck, E. Ben-Hur et I. Rosenthal. (1986). Photodynamic treatment of transplantable bladder tumors in rodents after pretreatment with chloroaluminum tetrasulfophthalocyanine. *J. Urol.* 136, p. 141-145.
- Silverberg, E. et J. A. Lubera. (1983). A review of american cancer society estimates of cancer cases and deaths. Dans A. I. Holleb (ed). *Cancer - A Cancer Journal for clinicians*. 33, p. 2-25.
- Spikes, J. D. (1983). Photosensitization in mammalian cells. Dans J. A. Parrish et al. (eds). *Photoimmunology*. p. 23-49. Plenum New-York.
- Spikes, J. D. (1986). Yearly review. Phthalocyanines as

photosensitizer in biology systems and for the photodynamic therapy of tumors. Photochem. Photobiol. 43, p. 691-699.

Stanker, L. H., M. Vanderlaan et H. Juarez-Salinas. (1985). One-step purification of mouse monoclonal antibodies from ascites fluid by hydroxylapatite chromatography. Journal of Immunological Methods. 76, 157-169.

Stocker, J. W. et C. H. Heusser. (1979). Methods for binding cells to plastic: application to a solid-phase radioimmuno-assay for cell-surface antigens. Journal of Immunological Methods. 26, p. 87-95.

Straight, R. C. et J. D. Spikes. (1985a). Photosensitized oxidation of biomolecules. Dans A. A. Frimer (ed.). Singlet Oxygen, vol. IV, p. 91-143. CRC Press. Boca Raton.

Talbot, B. G., S. J. MacLean et D. M. Gibson. (1985). Monoclonal Hybridoma screening by analysis of immunoglobulin light chains. Journal of Immunological Methods. 79, p. 283-291.

Vogel, S. N., Rosenstreich, D. L. (1979). Defective Fc receptors mediated phagocytosis in C34/HeJ macrophages. I. Correction by lymphokine induced stimulation. J. Immunol. 123, p. 2842-2850.

Wagner, J. R., H. Ali, R. Langlois, N. Brasseur et J. E. van Lier. (1987). Biological activities of phthalocyanine VI. Photooxidation of L-tryptophan by selectively sulfonated gallium

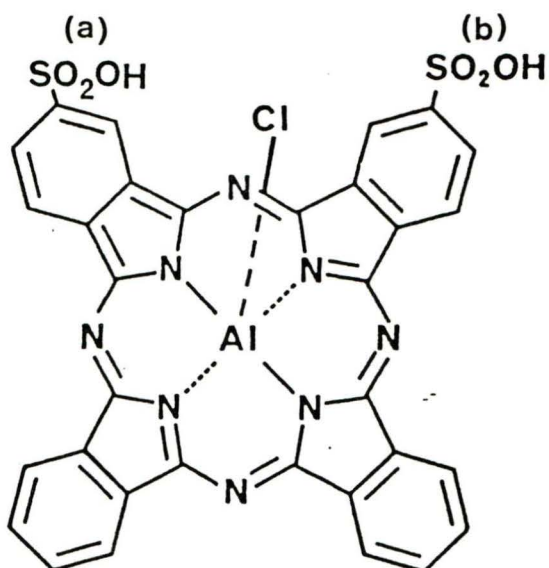
Phthalocyanines: singlet oxygen yields and effect of aggregation.

Photochem. Photobiol. 45, p. 587-595.

ANNEXE 1

STRUCTURE DES ALUMINIUM CHLORO SULFOPHTHALOCYANINES

La structure de l'aluminium chloro disulfonés adjacents phthalocyanine est ici illustrée comme exemple. On remarquera les différents sites d'attachement des groupements sulfonés sur un noyau benzène. Le groupement (a) est fixé sur le carbone 4 tandis qu'on retrouve le (b) en position 3.



ANNEXE 2

CHROMATOGRAMME SUR HPLC ANALYTIQUE DES CHLORO ALUMINIUMS SULFOPHTHALOCYANINES

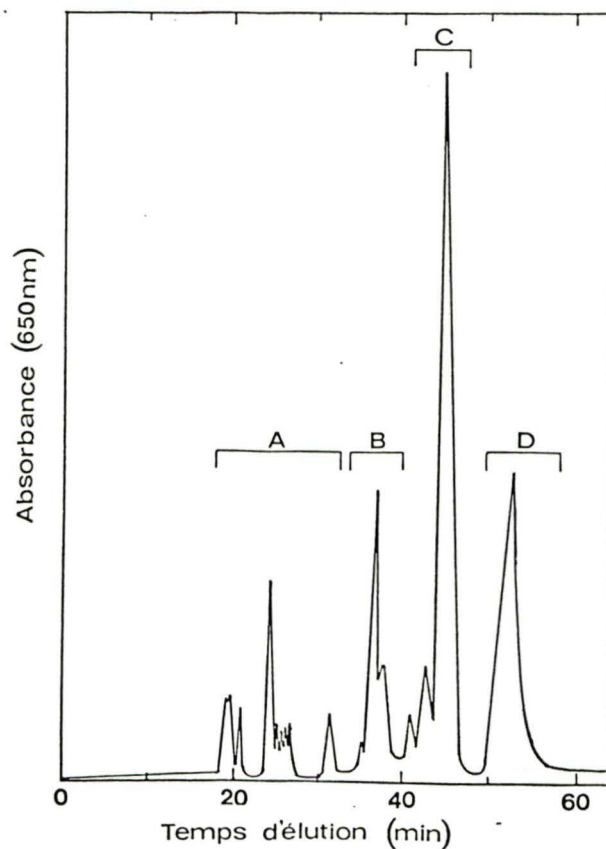


Fig. 15. Chromatogramme sur HPLC analytique des AlCl-SPC. Une colonne en phase inverse C-18 (ODS-2 spherisorb 5 μ m, 25 cm de long par 0.94 cm de diamètre fut utilisée à un débit de 2 ml par min. Fraction (A) 40% de trisulfoné avec 60% de tetrasulfoné (rapport S/PC de 3.6), fraction (B) 30% de disulfoné (mélange des isomères les moins hydrophobes) et 70% de trisulfoné AlCl-SPC avec un rapport S/PC de 2.7, fraction (C) un mélange de 90% de disulfoné (l'isomère le plus hydrophobe) et 10% de disulfoné (isomères les moins hydrophobes) avec rapport S/PC 2.0 et fraction (D) le monosulfoné AlCl-SPC

ANNEXE 3

CALCUL DE LA DOSE D'IRRADIATION

Le calcul de la dose d'irradiation s'effectue en 5 étapes. Premièrement, la figure 15 nous renseigne sur le profil d'émission des photons en fonction de la longueur d'onde pour la lampe tungsten/halogen conjugué au filtre rouge Corning 2418. On y mesure le nombre total de photons émis entre 590 et 700 nm à l'aide du photomètre Li-Cor (Li-185B). Ce range de longueur d'onde nous est imposé par les limites intrinsèques du système filtre -détecteur. Ensuite, on calcule la surface sous cette courbe d'émission et on établit le rapport du nombre de photons émis par unité de surface.

Deuxièmement, on sait que le pic d'absorption du monomère de AlCl-SPC s'étend de 650 à 690 nm. On évalue donc la surface correspondante par bandes de 10 nm.

Troisièmement, on calcule le nombre de photons émis sous chacune de ces bandes de 10 nm selon le rapport précédemment calculé.

Quatrièmement, on calcule le nombre de joule/m² sec équivalent à chacune de ces bandes en utilisant la longueur d'onde moyenne de chacune d'elle.

Finalement, en additionnant ces derniers résultats on obtient la dose d'irradiation totale correspondante au pic d'absorption du monomère

de $\text{AlCl}_3\text{-SPC}$.

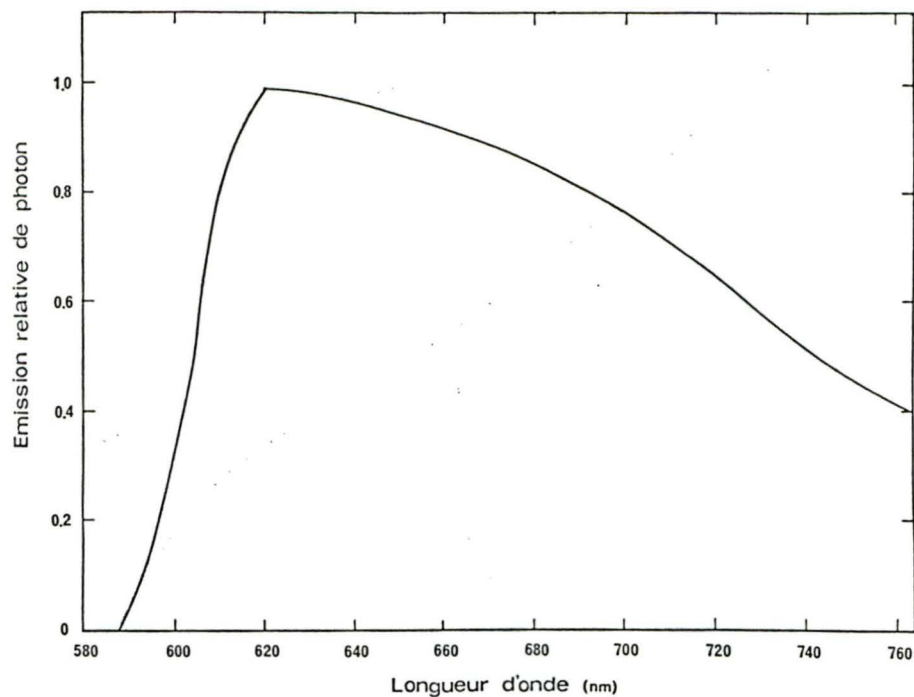


Fig. 16. Spectre d'émission relative de photons pour la lampe tungsten/halogen conjuguée au filtre Corning 2418. On remarquera la non linéarité du spectre où seulement la portion comprise entre 650 et 690 nm sert à photoactiver l'aluminium chloro sulfophthalocyanine. Le graphe a été tracé à l'aide d'un monochromateur Jobin Yvon H-10 V et d'un photomultiplicateur EMI PM-9785 B.